



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2013

**Sofia Manuela da Silva
Santos**

**Interação de alguns componentes do vinho com
um filme de quitosana**



**Sofia Manuela da Silva
Santos**

Interação de alguns componentes do vinho com um filme de quitosana

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes, pós-doc do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Este trabalho é financiado pela FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, União Europeia, QREN, FEDER e COMPETE através da Unidade de Investigação QOPNA (Project PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296) e no âmbito dos projetos (PTDC/AGR-ALI/101251/2008; SFRH/BPD/46584/2008).

o júri

presidente

Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo

Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

Professor Doutor Fernando Jorge Andrade Gonçalves

Professor adjunto no Departamento das Indústrias Alimentares da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu

orientador

Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva

Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus orientadores, Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Cláudia Nunes. Muito obrigada por tudo mesmo!

A todos os meus colegas de laboratório, em especial à Angélica Rocha, à Élia Maricato, à Lisete Silva, ao Ângelo Salvador e ao Mickael Santos, e também à Dulce Helena.

Aos meus verdadeiros amigos, vocês sabem quem são.

Ao meu Pai, aos meus Tios Alberto e Maria, aos meus Primos e ao meu Mano.

A todos, o meu muito, muito, sincero obrigada, por fazerem parte desta caminhada, por todo o apoio, dedicação e compreensão, por me terem ajudado a concluir mais uma etapa da minha vida!

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo.”

Fernando Pessoa

palavras-chave

Quitosana, oxidação do vinho, compostos fenólicos, íons metálicos, atividade antioxidante, capacidade de adsorção.

resumo

A quitosana é um polissacarídeo linear constituído por resíduos de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina que, devido às suas propriedades físico-químicas e atividades biológicas, tem sido aplicada em várias áreas, nomeadamente, na área alimentar. Recentemente, foram desenvolvidos filmes à base de quitosana reticulados com genipina que, devido à sua atividade antimicrobiana e antioxidante, demonstraram ter capacidade de atuar como conservantes do vinho.

O principal objetivo deste trabalho consistiu em estudar as possíveis interações entre o filme de quitosana reticulada com genipina e alguns componentes do vinho, nomeadamente, compostos fenólicos e catião Fe (II), que são os principais compostos responsáveis pelas reações de oxidação-redução do vinho, com o intuito de perceber como é que os filmes de quitosana são conservantes.

O catião Fe (II) e três classes diferentes de compostos fenólicos, ácidos fenólicos (AF), monómeros e oligómeros flavonóides (MOF) e antocianinas (ANTOC) foram estudados em soluções modelo de vinho (10% de etanol e pH 3,5), na presença e ausência do filme à base de quitosana.

Os resultados obtidos demonstraram que existiu interação entre todos os compostos estudados e o filme à base de quitosana. O filme de quitosana tem muito mais afinidade para o catião Fe (II) em comparação com os compostos fenólicos. Em relação às três frações de compostos fenólicos, o filme apresentou maior velocidade de remoção dos compostos em solução para as frações de monómeros e oligómeros flavonóides e antocianinas. Verificou-se também que um aumento na área de filme à base de quitosana levou a uma maior quantidade de composto adsorvido pelo filme. Na presença simultânea de compostos fenólicos (fração de ANTOC) e catião Fe (II), o filme de quitosana apresentou a mesma velocidade de remoção de Fe (II) da solução, o que permitiu inferir que a presença de compostos fenólicos não interfere na remoção do Fe (II). Com os resultados deste trabalho concluiu-se que o filme de quitosana reticulado com genipina tem um efeito de inibição da oxidação nos vinhos essencialmente devido à sua capacidade de remover o catião Fe (II), que deixa de estar livre em solução. Por outro lado, a quantidade de compostos fenólicos adsorvida pelo filme de quitosana é muito baixa quando comparada com a quantidade total destes compostos presentes no vinho, permitindo assim manter as suas características organolépticas.

keywords

Chitosan, wine oxidation, phenolic compounds, metal ions, antioxidant activity, adsorption capacity.

abstract

Chitosan is a linear polysaccharide composed by residues of D-glucosamine and *N*-acetyl-D-glucosamine. This polysaccharide has physicochemical properties and biological activities and has been applied in various areas, particularly, in food industry. Recently, chitosan based films crosslinked with genipin have been developed and have demonstrated ability to act as wine preservatives due to their antimicrobial and antioxidant activity.

The aim of this work was to study the possible interactions between the films based on chitosan and some wine components, such as phenolic compounds and Fe (II) cation, which are the main compounds responsible for the oxidation-reduction of wine. This will allow to understand how the films of chitosan act as preservatives.

Fe (II) cation and three different classes of phenolic compounds, phenolic acids (FA), monomeric and oligomeric flavonoids (MOF) and anthocyanins (ANTOC) were studied in wine model solutions (10% ethanol, pH 3.5) in the presence and absence of the chitosan based film.

The results obtained showed that there was interaction between all the studied compounds and the film based on chitosan. The chitosan film has much more affinity for the cation Fe (II) in comparison with phenolic compounds. For the three fractions of phenolic compounds, the film presented a faster removal of the compounds in solution for MOF and ANTOC. It was also found that increasing the area of the chitosan film, a higher amount of compounds is adsorbed by the film. In the simultaneous presence of phenolic compounds (ANTOC fraction) and cation Fe (II), the chitosan film exhibited the same removal rate of Fe (II) from the solution, allowing to conclude that the presence of phenolic compounds do not interfere with the removal of Fe (II).

With the results of this study it was concluded that the film of chitosan crosslinked with genipin has an effect of inhibiting oxidation in the wines mainly due to its ability to remove Fe (II) cation, which is no longer free in solution. On the other hand, the amount of phenolic compounds adsorbed by the chitosan film is very low when compared to the total amount of these compounds in wine. Thus, the organoleptic characteristics of the wine are maintained.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AC - Ácido cafeico

AF - Ácidos fenólicos

AG - Ácido gálico

ANTOC - Antocianinas

CMR - Capacidade máxima de retenção

MOF - Monómeros e oligómeros flavonóides

OMS - Organização Mundial de Saúde

OIV - Organização Internacional da Vinha e do Vinho

PPO - Polifenoloxidasas

PVP - Polivinilpirrolidona

ÍNDICE

Júri

Agradecimentos

Resumo

Abstract

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLO-----	i
ÍNDICE-----	iii
LISTA DE FIGURAS -----	v
1. INTRODUÇÃO-----	1
1.1. Oxidação do vinho-----	1
1.1.1. Principais compostos responsáveis pela oxidação do vinho -----	2
1.2. Quitosana: Características, propriedades e funcionalidades--	9
1.2.1. Capacidade de adsorção de diferentes compostos pela quitosana -----	14
1.2.1.1. Adsorção de compostos fenólicos pela quitosana-----	15
1.2.1.2. Adsorção de iões metálicos pela quitosana -----	16
2. ENQUADRAMENTO DO TRABALHO-----	19
2.1. Objetivos do trabalho-----	20
3. MATERIAL E MÉTODOS-----	21
3.1. Preparação de filmes à base de quitosana reticulados com genipina -----	21
3.2. Fracionamento de vinho tinto -----	21
3.3. Estudo das interações entre componentes do vinho e o filme à base de quitosana -----	22
3.3.1. Estudos com o ácido cafeico-----	23
3.3.2. Estudos com as frações de compostos fenólicos (AF, MOF, ANTOC)--	23
3.3.3. Estudos com o catião Fe (II)-----	24
3.3.4. Estudos com o catião Fe (II) e a fração de antocianinas em simultâneo-	24
3.3.5. Estudo de saturação do filme à base de quitosana com o catião Fe (II)-	25
3.4. Determinação de compostos fenólicos pelo método do ABTS -----	26
3.5. Determinação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu -----	27
3.6. Determinação do catião Fe (II) pelo método da <i>o</i> -fenantrolina -----	28

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	31
4.1. Estudo das interações entre compostos fenólicos e o filme à base de quitosana -----	31
4.1.1. Estudos com o ácido cafeico-----	31
4.1.2. Compostos fenólicos extraídos do vinho tinto -----	35
4.1.3. Estudos com a fração de ácidos fenólicos-----	37
4.1.4. Estudos com a fração de monómeros e oligómeros flavonóides -----	39
4.1.5. Estudos com a fração de antocianinas-----	42
4.2. Estudo das interações entre o catião Fe (II) e o filme à base de quitosana -----	47
4.2.1. Estudos com o catião Fe (II) -----	47
4.3. Interação do Fe (II) e a fração de antocianinas com o filme de quitosana-----	53
5. CONCLUSÃO -----	59
6. PERSPECTIVAS FUTURAS -----	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	63
8. ANEXOS -----	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos principais compostos não-flavonóides presentes no vinho.

Figura 2. Estrutura dos principais compostos flavonóides presentes no vinho.

Figura 3. Processo de oxidação de catecóis catalisado por iões ferro e cobre.

Figura 4. Redução do oxigénio no vinho.

Figura 5. Reação de Fenton.

Figura 6. Estruturas da quitina (**A**) e da quitosana (**B**).

Figura 7. Estrutura proposta da quitosana reticulada com o genipin.

Figura 8. Estrutura proposta da quitosana após reticulação com um composto fenólico: ácido cafeico.

Figura 9. Evolução da concentração de ácido cafeico em solução modelo de vinho, ao longo de 8 dias, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (12 cm²) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Figura 10. Evolução da concentração de ácido cafeico em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (16 cm²) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Figura 11. Evolução da concentração de ácido cafeico em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (20 cm²) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Figura 12. Espectro UV/Visível, obtido entre os 250 e os 700 nm, das frações de compostos fenólicos obtidos pelo fracionamento do vinho tinto: extrato de ácidos fenólicos (AF), extrato de monómeros e oligómeros flavonóides (MOF) e extrato de antocianinas (ANTOC).

Figura 13. Evolução da concentração de AF em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (12 cm²) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Figura 14. Estudo com a fração de AF, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de AF adsorvidos pelo filme ao longo do tempo, pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin.

Figura 15. Linha de tendência adicionada aos dados do estudo com a fração de AF, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de AF adsorvidos pelo filme nos primeiros 5 a 20 dias, pelo método de Folin- Ciocalteu.

Figura 16. Evolução da concentração de MOF em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (12 cm²) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Figura 17. Estudo com a fração de MOF, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de MOF adsorvidos pelo filme ao longo do tempo, pelo método (A) do ABTS e pelo método (B) de Folin-Ciocalteu.

Figura 18. Linha tendência adicionada aos dados do estudo com a fração de MOF, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de MOF adsorvidos pelo filme nos primeiros 5 a 20 dias, pelo método de Folin- Ciocalteu.

Figura 19. Evolução da concentração de ANTOC em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (12 cm²) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Figura 20. Estudo com a fração de ANTOC, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de ANTOC adsorvidas pelo filme, ao longo do tempo, pelo (A) método do ABTS e (B) pelo método de Folin- Ciocalteu.

Figura 21. Linha tendência adicionada aos dados do estudo com a fração de ANTOC, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de ANTOC adsorvidas pelo filme nos primeiros 5 a 20 dias, pelo método de Folin- Ciocalteu.

Figura 22. Evolução da concentração de ANTOC em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (20 cm²) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Figura 23. Estudo com a fração de ANTOC, utilizando 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de ANTOC adsorvidas pelo filme ao longo do tempo, pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Figura 24. Linha tendência adicionada aos dados do estudo com a fração de ANTOC, utilizando 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de ANTOC adsorvidas pelo filme durante os primeiros 20 dias, pelo método de Folin-Ciocalteu.

Figura 25. Evolução da concentração de Fe (II) em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana, pelo método da *o*-fenantrolina, utilizando (A) 12 cm² e (B) 20 cm² de filme de quitosana.

Figura 26. Estudo com Fe (II), utilizando (A) 12 cm² e (B) 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de Fe (II) adsorvido pelo filme, ao longo do tempo, pelo método da *o*-fenantrolina.

Figura 27. Estudo com Fe (II), utilizando 12 cm² (A) e 20 cm² (B) de filme à base de quitosana, representando a massa de Fe (II) adsorvido (µg) por cm² de filme de quitosana, ao longo do tempo, pelo método da *o*-fenantrolina.

Figura 28. Linha de tendência adicionada aos dados do estudo com Fe (II), utilizando (A) 12 cm² e (B) 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de Fe (II) adsorvido pelo filme durante os primeiros 5 dias, pelo método da *o*-fenantrolina.

Figura 29. Esquema do estudo realizado para testar a saturação do filme de quitosana utilizado no ensaio A do ponto 4.2.1.

Figura 30. Evolução da concentração de Fe (II) na presença da fração de ANTOC, (A) na proporção de 3:1 e (B) na proporção de 1:4, em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (20 cm²), pelo método da *o*-fenantrolina.

Figura 31. Evolução da concentração de ANTOC na presença de Fe (II), na proporção de 4:1, em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (20 cm²), pelo método de Folin-Ciocalteu.

Figura 32. Estudo com Fe (II) e fração de ANTOC na proporção de 3:1 (gráfico A) e na proporção de 1:4 (gráfico B) utilizando 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de Fe (II) adsorvido pelo filme ao longo do tempo, pelo método da *o*-fenantrolina.

Figura 33. Linha de tendência adicionada aos dados do estudo com Fe (II) e fração de ANTOC, na proporção de 3:1 (gráfico A), utilizando 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de Fe (II) adsorvido pelo filme durante os primeiros 5 dias, pelo método da *o*-fenantrolina.

Figura 34. Linha de tendência adicionada aos dados do estudo com Fe (II) e fração de ANTOC na proporção de 3:1 (gráfico A) e na proporção de 1:4 (gráfico B) utilizando 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de Fe (II) adsorvido pelo filme durante os primeiros 15 dias, pelo método da *o*-fenantrolina.

Figura 35. Curva de calibração do ácido gálico (A) pelo método do ABTS e (B) pelo método de Folin-Ciocalteu.

Figura 36. Curva de calibração do ácido cafeico pelo método de Folin-Ciocalteu.

Figura 37. Curva de calibração do catião Fe (II) pelo método da *o*-fenantrolina.

1. INTRODUÇÃO

A quitosana é um polissacarídeo que, devido às suas atividades biológicas e propriedades físico-químicas, tem sido aplicada em diversas áreas, nomeadamente na área alimentar. Recentemente, foi desenvolvida uma metodologia para aplicar a quitosana durante a vinificação e armazenamento do vinho. Nesta nova metodologia, são utilizados filmes à base de quitosana, reticulados com genipina, que são colocados em contacto com o vinho, logo após a fermentação. O filme à base de quitosana demonstrou ter capacidade de conservar este produto, prevenindo a degradação causada pelos microrganismos e os processos oxidativos que ocorrem no vinho durante o seu armazenamento [1,2].

O vinho é uma bebida obtida a partir da fermentação alcoólica do mosto da uva. O etanol e o glicerol, provenientes da fermentação alcoólica, juntamente com a água, são os principais componentes do vinho, representando mais de 90 % da sua constituição. No entanto, o vinho é uma matriz hidro-alcoólica com uma grande complexidade química, apresentando ainda na sua constituição açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, aminoácidos, sais minerais, e também em menor proporção, algumas vitaminas, polissacarídeos, ésteres e acetaldeído [3,4].

Muitos constituintes do vinho, principalmente os compostos fenólicos e certos iões metálicos, são suscetíveis de serem oxidados, participando em várias reações de oxidação-redução que ocorrem no vinho e que podem alterar a sua estabilidade e qualidade [5].

1.1. Oxidação do vinho

A química de oxidação-redução do vinho é de grande importância na sua estabilidade e qualidade. Muitas reações de oxidação podem ter resultados deletérios no vinho, tais como o escurecimento nos vinhos brancos e rosé e a produção de aromas e sabor indesejáveis. Contudo, para os vinhos tintos, um certo grau de oxidação é desejável e pode ser benéfico, uma vez que a exposição limitada ao oxigénio pode resultar numa diminuição da adstringência e também numa melhoria e estabilidade da cor do vinho [6,7].

A oxidação do vinho pode ser classificada em oxidação enzimática e oxidação não-enzimática, a primeira ocorre maioritariamente no mosto e a segunda ocorre principalmente no vinho [5,8]. Uma das principais diferenças entre estes dois fenómenos oxidativos é a velocidade das reações, sendo a reação enzimática um processo muito mais rápido.

As polifenoloxidasas (PPO) são enzimas responsáveis pelas reações de oxidação, levando à formação de quinonas. As quinonas formadas podem polimerizar entre si, levando à formação de pigmentos acastanhados com elevado peso molecular [5,9,10]. As reações enzimáticas ocorrem maioritariamente no mosto pois a atividade das polifenoloxidasas diminui durante a fermentação, já que estas enzimas são inibidas pelo etanol [11]. No entanto, o escurecimento do vinho é maioritariamente devido à oxidação não-enzimática, ou seja, às reações químicas que podem ocorrer no produto já engarrafado e causar prejuízos económicos consideráveis [12]. Durante o processo de escurecimento não-enzimático, e ao contrário das reações enzimáticas, as reações de autooxidação do vinho são muito lentas, podendo requerer semanas ou meses, devido ao baixo valor de pH do vinho, necessitando sempre da presença de ferro e cobre [8,12,13,14].

1.1.1. Principais compostos responsáveis pela oxidação do vinho

- **Compostos fenólicos no vinho**

O termo “polifenólico” descreve os compostos que possuem um anel benzénico substituído com vários grupos hidroxilo. Os compostos fenólicos podem ser classificados em compostos não-flavonóides e flavonóides, estando representados nas Figuras 1 e 2, respetivamente, os principais compostos fenólicos existentes no vinho [8,15].

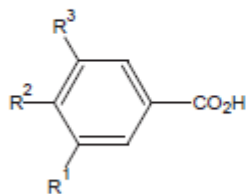
Os principais compostos não-flavonóides presentes no vinho são os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzoico e cinâmico) e os estilbenos. Os compostos flavonóides presentes no vinho são principalmente pertencentes às subclasses dos flavonóis, flavan-3-óis e antocianinas, e também em menor proporção os flavanonóis e flavonas. Para além destas duas classes de compostos fenólicos existem ainda os compostos fenólicos voláteis [8,15]. Comparativamente com os vinhos tintos, os vinhos

brancos contêm níveis menores de compostos fenólicos, que são na sua maioria ácidos hidroxicinâmicos. No entanto, estes compostos continuam a ser importantes para as reações de oxidação no acastanhamento do vinho e na perda do aroma varietal [8].

Os compostos fenólicos com funções di-hidroxi vicinais (grupo catecol), tais como o ácido cafeico e catequina, exercem um efeito antioxidante sobre o vinho pois são capazes de formar uma semi-quinona radical estável. Esta, por sua vez, reage com radicais livres de espécies de oxigénio reativas que podem estar presentes no vinho. Estes compostos, portanto, representam um antioxidante natural do vinho [16,17]. Contudo, os compostos fenólicos também podem ser o substrato da oxidação não enzimática [18]. A oxidação dos compostos fenólicos leva a reações de condensação com a formação de polímeros castanhos, que são mais estáveis do que as formas monoméricas iniciais [11]. Um aumento do pH do vinho aumenta a sua capacidade de produção de pigmentos castanhos porque, apesar dos compostos fenólicos serem ácidos fracos e o vinho ser muito mais ácido do que os seus pKa, há uma percentagem de iões de fenolatos suscetíveis de serem oxidados. Assim, um aumento do pH, aumenta a presença de iões de fenolato, levando, consequentemente, a uma maior produção de pigmentos castanhos [11,19].

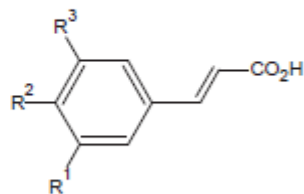
COMPOSTOS NÃO-FLAVONÓIDES

Derivados dos ácidos benzoico e cinâmico



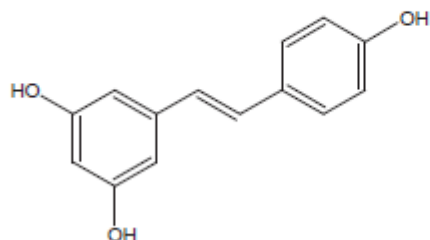
Ácido benzóico
 Ácido *p*-hidroxibenzoico
 Ácido protocatecuico
 Ácido vanílico
 Ácido gálico
 Ácido siringico

R ¹	R ²	R ³
H	H	H
H	OH	H
OH	OH	H
OCH ₃	OH	H
OH	OH	OH
OCH ₃	OH	OCH ₃



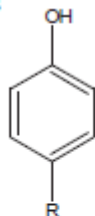
Ácido cinâmico
 Ácido *p*-cumárico
 Ácido cafeico
 Ácido ferúlico
 Ácido sinápico

Estilbenos

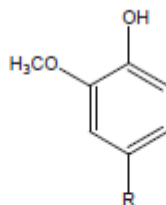


trans-Resveratrol

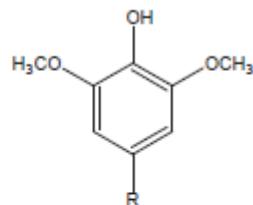
Fenóis voláteis



Etilfenol ($R=CH_2CH_3$)
 Vinilfenol ($R=CHCH_3$)



Guaiacol ($R=H$)
 Metilguaiacol ($R=CH_3$)
 Etilguaiacol ($R=CH_2CH_3$)
 Vinilguaiacol ($R=CHCH_3$)

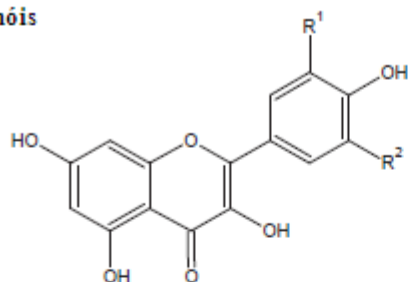


Siringol ($R=H$)
 Metilsiringol ($R=CH_3$)

Figura 1. Estrutura dos principais compostos não-flavonóides presentes no vinho [8].

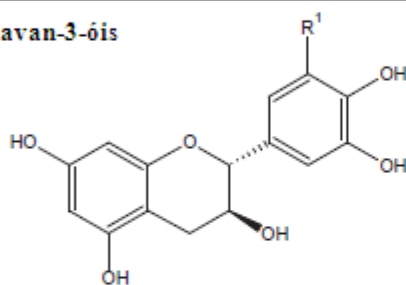
COMPOSTOS FLAVONÓIDES

Flavonóis

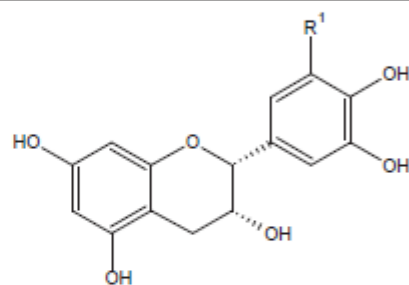


Campferol ($R^1=R^2=H$)
 Quercitina ($R^1=OH, R^2=H$)
 Miricetina ($R^1=R^2=OH$)

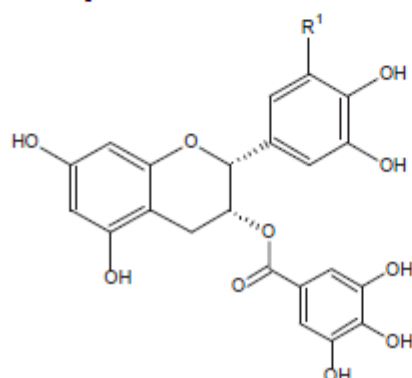
Flavan-3-óis



(+)-Catequina ($R^1=H$)
 (+)-Galocatequina ($R^1=OH$)

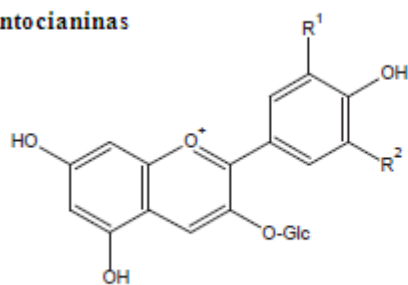


(-)-Epicatequina ($R^1=H$)
 (-)-Epigallocatequina ($R^1=OH$)



(-)-Epicatequina galato ($R^1=H$)
 (-)-Epigallocatequina galato ($R^1=OH$)

Antocianinas



Cianidina 3-glucosídeo ($R^1=OH, R^2=H$)
 Peonidina 3-glucosídeo ($R^1=OCH_3, R^2=H$)
 Delfinidina 3-glucosídeo ($R^1=R^2=OH$)
 Petunidina 3-glucosídeo ($R^1=OH, R^2=OCH_3$)
 Malvidina 3-glucosídeo ($R^1=R^2=OCH_3$)

Figura 2. Estrutura dos principais compostos flavonóides presentes no vinho [8].

Na oxidação não enzimática do vinho, também designada de oxidação química do vinho, o processo oxidativo é favorecido pela presença de compostos fenólicos contendo um anel catecol (*orto*-di-hidroxibenzeno) ou galoilo (1,2,3-tri-hidroxibenzeno). Assim, compostos como a (+)-catequina, a (-)-epicatequina, a galocatequina, o ácido gálico e seus ésteres, e o ácido cafeico são os constituintes do vinho mais rapidamente oxidados. Estes substratos são sequencialmente oxidados a semi-quinonas e a benzoquinonas enquanto o oxigénio é reduzido a peróxido de hidrogénio, sendo todo o processo catalizado pelo ciclo redox dos iões $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ e $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$, tal como esquematizado na Figura 3 [5,12,20].

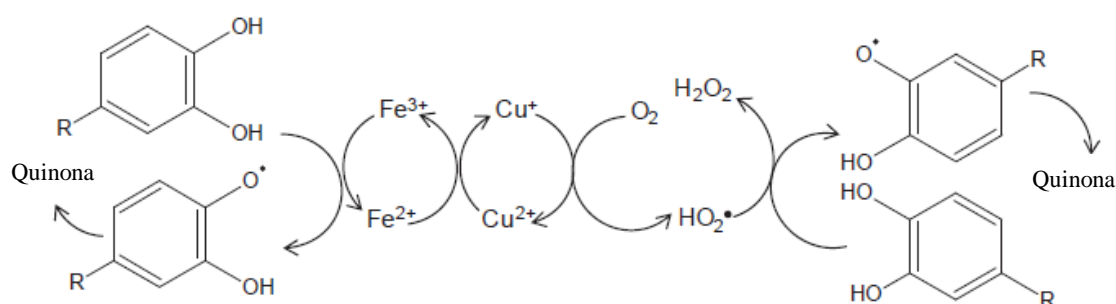


Figura 3. Processo de oxidação de catecóis catalisado por iões ferro e cobre [20].

As quinonas formadas da oxidação de compostos fenólicos são instáveis e podem participar noutras reacções. Estes compostos podem combinar espontaneamente com compostos nucleofílicos (incluindo alguns fenóis, tióis e aminas) devido ao seu elevado carácter eletrofílico. Para além disso, os dímeros e polímeros produzidos podem rearranjar as suas estruturas para formar novos radicais di-hidroxibenzeno. Assim, é referido que a oxidação destes produtos resulta numa aceleração do processo de polimerização e, consequentemente, no escurecimento do vinho [5,8].

Em resumo, o escurecimento não-enzimático do vinho pode ocorrer através de várias vias relacionadas com os compostos fenólicos, sendo uma das mais importantes a oxidação de compostos fenólicos e subsequente polimerização dos produtos oxidados, onde o primeiro passo é catalisado pelos iões cobre e ferro. Existem também outras vias que envolvem reacções de polimerização entre compostos fenólicos e outros compostos presentes no vinho, incluindo a condensação com o acetaldeído ou o glioxalato (resultante da oxidação do tartarato).

- **Os metais no vinho**

A maioria dos metais presentes no vinho são importantes para uma fermentação alcoólica eficiente. Os íons de Ca, K, Mg e Na participam na regulação do metabolismo celular das leveduras, mantendo o equilíbrio iónico. Outros metais, como o Cu, Fe, Mn e Zn e alguns metais vestigiais, são também favoráveis para as leveduras pois são necessários para a ativação de metalo-enzimas [21,22]. No entanto, os metais afetam as características organoléticas do vinho, incluindo o sabor, frescura, cor e aroma, sobretudo devido ao facto de participarem nas reações de oxidação de alguns componentes presentes no vinho (como os compostos fenólicos), podendo também levar à formação de precipitados durante a maturação do vinho, fermentação e armazenamento [23,24,25].

O fenómeno de escurecimento do vinho envolve uma cascata de reações de oxidação de compostos orgânicos presentes no vinho, onde, aparentemente, os íons Cu^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} ativam o oxigénio molecular e promovem as reações de oxidação dos compostos orgânicos levando à formação de espécies reativas de oxigénio [21,26,27]. Além disso, sabe-se que os catiões de Fe catalisam a oxidação de substâncias polifenólicas e o Mn, promove a formação de acetaldeído, o qual reage com os compostos fenólicos em reações mediadas pelos catiões de Fe, produzindo precipitados [21,28].

Nos vinhos, as espécies reativas de oxigénio podem ser produzidas por íons de metais de transição reduzidos (por exemplo Fe^{2+}), pela adição gradual de um único eletrão para o oxigénio molecular. A transferência inicial de um eletrão leva à formação do anião radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) que, ao pH do vinho existe na forma protonada, como radical hidroperoxilo ($\text{HOO}\bullet$). A transferência de um segundo eletrão produzirá o anião peróxido (O_2^{2-}) que, ao pH do vinho, existe na forma protonada, formando peróxido de hidrogénio (H_2O_2). O passo de redução seguinte leva à formação de um oxidante ainda mais reativo, o radical hidroxilo ($\text{HO}\bullet$), que pode remover um átomo de hidrogénio dos compostos orgânicos para produzir água, o produto final da redução do oxigénio, tal como exemplificado na Figura 4 [29,30].

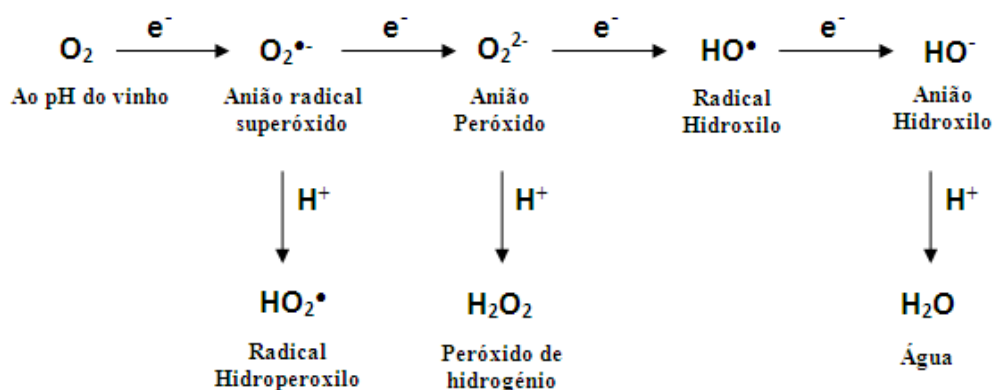


Figura 4. Redução do oxigénio no vinho (adaptado de [20]).

A redução catalisada, por iões metálicos, do H_2O_2 é também um passo importante na oxidação não enzimática do vinho. O peróxido de hidrogénio em associação com iões ferrosos tende também a gerar espécies reativas de oxigénio, tal como o radical hidroxilo, fenómeno que é conhecido como a reação Fenton (Figura 5) [8, 30,31]. O radical hidroxilo é um produto reduzido do oxigénio e é reconhecido por oxidar quase todas as moléculas orgânicas encontradas no vinho. Devido à sua não seletividade, este radical reagirá com a primeira espécie que encontrar, tal como o etanol, o ácido tartárico, o glicerol, açúcares e ácidos orgânicos, dependendo apenas da sua concentração [30,31]. Alguns autores afirmam ainda que a principal função antioxidante de SO_2 no vinho é a de reagir com H_2O_2 , limitando assim a oxidação do etanol e de outros compostos [20,32].



Figura 5. Reação de Fenton.

A oxidação de antocianinas, taninos e acetaldeído depende diretamente da concentração de alguns catiões presentes no vinho, tais como ferro, cobre e manganês [33,34]. A taxa de oxidação da (+)-catequina e a extensão do escurecimento do vinho aumenta com a concentração de ferro ((II)), aumentando também a formação de compostos incolores e pigmentos amarelos [33,35].

Se o vinho for mantido sob condições herméticas, o ferro, estando em meio redutor, existe exclusivamente na forma ferrosa, como ferro ((II)), sendo solúvel, mesmo quando presente em grandes quantidades. No entanto, quando se dissolve oxigénio no vinho, este oxida o Fe^{2+} a Fe^{3+} , sendo responsável pela precipitação de matéria corada e pela turvação nos vinhos brancos [33,36]. Se o ferro e o cobre forem removidos de um vinho, o oxigénio não é consumido ou é muito lentamente. Se o conteúdo de cobre e de ferro for resposto, o consumo específico de oxigénio aumenta significativamente [37]. Alguns metais de transição, especialmente o cobre e o ferro que catalisam a oxidação, são fundamentais para o processo de escurecimento não-enzimático do vinho pois o oxigénio molecular não oxida diretamente os compostos fenóis no vinho [5,35,38,39].

1.2. Quitosana: Características, propriedades e funcionalidades

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação, em meio alcalino, da quitina. A quitina é o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose, e pode ser extraída do exosqueleto de crustáceos, das cutículas de insetos e das paredes celulares dos fungos. A quitosana é um polímero constituído por cadeias lineares de resíduos de D-glucosamina e *N*-acetil-D-glucosamina ligados por ligações β -(1-4) [40,41]. Na Figura 6 encontram-se representadas as estruturas da quitina e da quitosana.

Devido à insolubilidade da quitina, que não se dissolve na maioria dos solventes orgânicos, o desenvolvimento de polímeros derivados, contendo propriedades e funções avançadas, tem sido focado na quitosana [41,42].

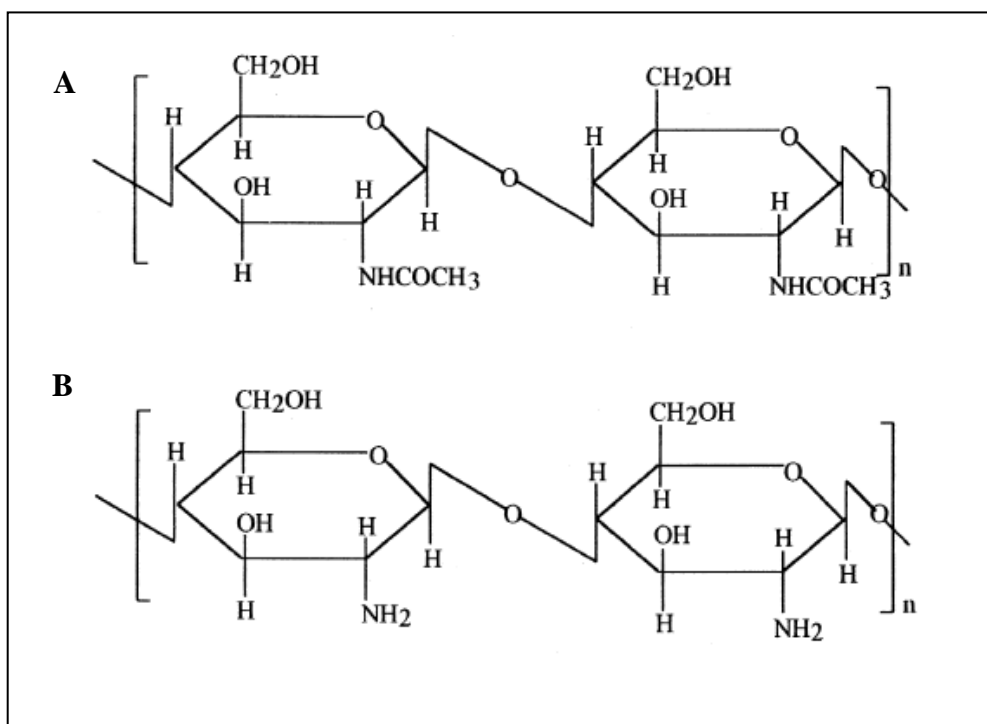


Figura 6. Estruturas da quitina (A) e da quitosana (B) [42].

O polímero de quitosana tornou-se de grande interesse não apenas como um recurso subutilizado, mas também como um novo biomaterial funcional de elevado potencial em diversos domínios [41]. Para além das características de hidrofiliidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa imunogenicidade e baixa toxicidade, este polissacarídeo apresenta ainda outras propriedades importantes tais como: atividade antimicrobiana, atividade antioxidante e capacidade de adsorção de diversos compostos. Devido às suas propriedades a quitosana tem várias aplicações nas áreas da biotecnologia, biomedicina, cosmética, alimentar e indústrias têxteis [43,44,45]. O polímero pode ser utilizado sob diversas formas: em flocos, grânulos de gel, membranas, filmes, fibras, fibras ocas, esponja, ou depositado em materiais inertes (sílica, alumina, etc) [46].

A quitosana na forma de filme, por exemplo, tem sido utilizada com sucesso, ao nível laboratorial, para conservar vários tipos de alimentos como: ovos, frutas, vegetais e carnes. De um modo geral, os filmes de quitosana são biodegradáveis, biocompatíveis, flexíveis, duráveis, difíceis de quebrar e também inibem o crescimento microbiano. As propriedades mecânicas e a permeabilidade dos filmes à base de quitosana podem ser

controladas através da seleção do peso molecular, do solvente e da adição de agentes plastificantes, agentes de dispersão e de compatibilização, entre outros [47].

A quitosana é um polissacarídeo de interesse não só devido às suas importantes propriedades, mas também devido à presença do grupo funcional amina, que pode ser apropriadamente modificado, por exemplo, por reações químicas de acetilação, quaternização, alquilação, reticulação (“grafting”), reações com aldeídos e cetonas (para originar bases de Schiff), ou com agentes quelantes de metais, que podem proporcionar uma variedade de produtos com as mais distintas propriedades e funções biológicas. Os grupos hidroxilo funcionais também têm a sua importância e podem ser utilizados em diversas reações de modificação da quitosana como a *o*-acetilação, ligação-H com átomos polares, “grafting”, entre outras [41].

A quitosana é facilmente dissolvida em soluções ácidas diluídas com valores de pH abaixo de 6, pois possui grupos amina primários, sendo considerada uma base. A presença destes grupos amina faz com que o pH altere a carga e as propriedades da quitosana [48]. A pH ácido, estas aminas estão protonadas e tornam-se carregadas positivamente, o que faz da quitosana um polieletrólito catiónico solúvel em água. A quitosana pode facilmente formar sais quaternários de azoto a valores de pH baixos. Por outro lado, quando o pH aumenta acima de 6.0, as aminas da quitosana vão desprotonando, o polímero perde a sua carga e torna-se insolúvel. Assim, ácidos orgânicos, tais como o ácido acético, o ácido fórmico e o ácido láctico, são utilizados para dissolverem este polissacarídeo [41].

Quando a quitosana é aplicada em alimentos ácidos, é necessário tornar a quitosana mais resistente e insolúvel em meio ácido, sem que perca as suas propriedades, sendo necessário reticular o polímero.

A formação de associações intermoleculares mais fortes é possível através de processos de reticulação química (ligação covalente) onde são utilizados reagentes de reticulação (ou ligação cruzada), tais como: glioxal, formaldeído, glutaraldeído, epícloridrina, genipina e outros [49,50]. Os agentes de reticulação não estabilizam apenas a quitosana em soluções ácidas, tornando-a insolúvel, mas também a alteram em termos de propriedades mecânicas [47,50].

As reações de reticulação podem ser usadas para aumentar a resistência mecânica e estabilidade química, para controlar a permeabilidade e solubilidade em água, e para melhorar as características dos filmes à base de quitosana, mantendo as suas propriedades biológicas [47].

A genipina tem sido utilizada com sucesso como um eficaz agente de reticulação de polímeros que contêm grupos amina, tal como a quitosana, diminuindo a sua solubilidade em meio ácido. Os filmes de quitosana reticulados com genipina têm uma menor degradação. Além disso, este composto tem revelado uma menor citotoxicidade em comparação com o glutaraldeído, o agente reticulante mais utilizado para a quitosana [50]. Na Figura 7 é representada uma das estruturas proposta da quitosana reticulada com genipina.

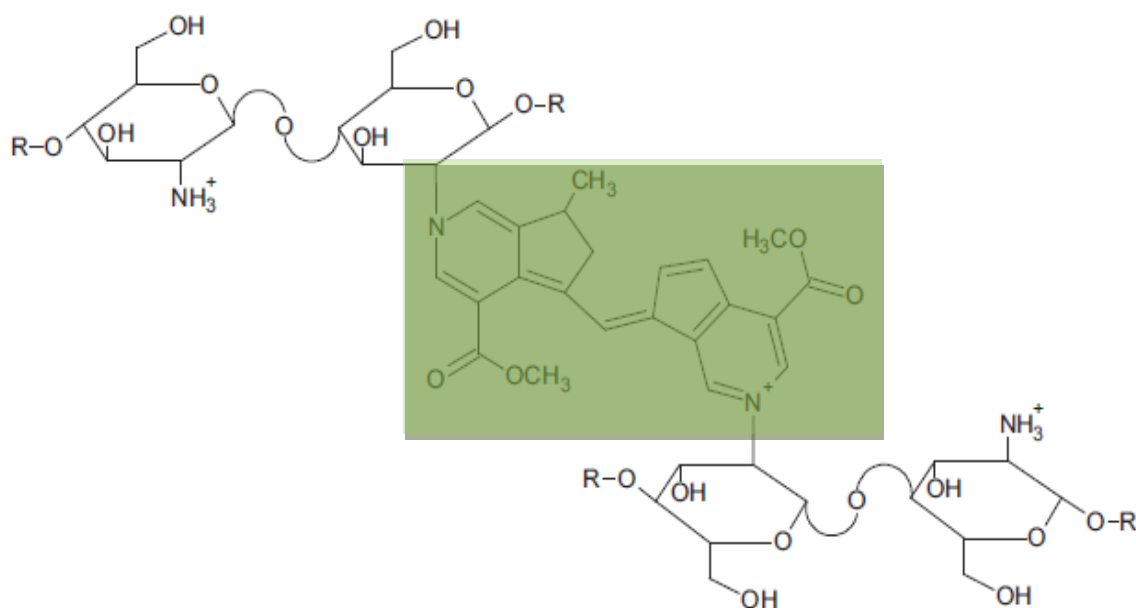


Figura 7. Estrutura proposta da quitosana reticulada com a genipina [50].

Muitos autores têm relatado a capacidade antioxidante da quitosana não modificada [42]. Além disso, foi colocada a hipótese de que tanto os grupos amino, como os grupos hidroxilo, contribuem para a sua capacidade antioxidante total [40,41]. No entanto, alguns estudos têm concentrado a sua atenção na ligação à matriz da quitosana de outros compostos, para melhorar as suas propriedades antioxidantes e promover a sua aplicabilidade. A derivatização da quitosana com grupos fenólicos é uma das possibilidades mais exploradas para aumentar a atividade antioxidante do polissacarídeo [50,51]. Os compostos fenólicos são conhecidos por possuírem propriedades antioxidantes, principalmente porque podem atuar como captadores de radicais livres uma vez que os grupos hidroxilo podem doar um eletrão ou um átomo de hidrogénio a um radical livre [47]. Por outro lado, a quitosana tem a capacidade de quelar iões metálicos envolvidos na catálise de reações oxidativas. Portanto, a introdução de grupos fenólicos na estrutura de quitosana permite a obtenção de uma nova matriz com os dois tipos de propriedades antioxidantes [50,51]. Na Figura 8 é apresentada uma das estruturas propostas da quitosana após “grafting” com o ácido cafeico.

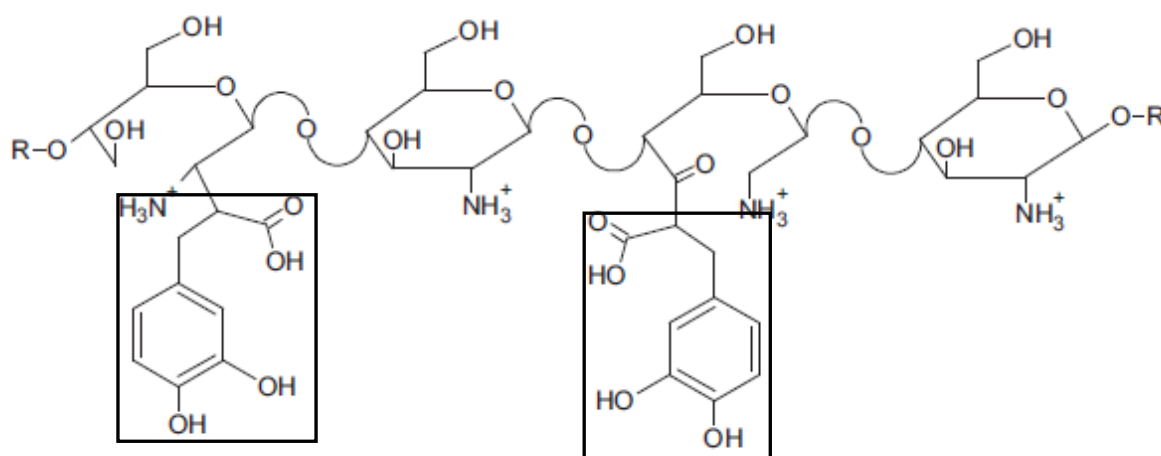


Figura 8. Estrutura proposta da quitosana após reticulação com um composto fenólico: ácido cafeico. Adaptado [50].

1.2.1. Capacidade de adsorção de diferentes compostos pela quitosana

A capacidade de adsorção de um sistema não pode ser facilmente prevista, uma vez que esta é altamente dependente de fatores tais como: propriedades do adsorvente (porosidade, área superficial, tamanho de partícula) e do adsorbato (estrutura, coeficiente de difusão, carga iônica, grupos funcionais, pKa, polaridade, funcionalidade, peso molecular e tamanho), condições da solução (solvente, pH, temperatura, força iônica, concentração de soluto e competição entre os solutos), grau de mistura e afinidade entre adsorbato e adsorvente e interações na interface sólido-líquido [52].

Em geral, o transporte do adsorbato pode ocorrer em quatro etapas consecutivas: (i) transporte do adsorbato a partir de uma solução (o adsorvido) para a camada limite em torno das partículas de adsorvente, (ii) transporte de soluto através da camada limite, (iii) difusão de intra-partículas de soluto nos poros, e (iv) adsorção e dessorção do adsorbato. O processo global pode ser controlado por um dos passos acima, ou por uma combinação deles. As características do adsorvente e a solução de adsorbato têm influência sobre o passo limitante do processo [52].

Devido às suas características estruturais e funcionais, a quitosana apresenta uma boa capacidade de adsorção para determinados compostos, podendo assim funcionar como um adsorvente [52,12]. A presença de um grande número de grupos amina na cadeia de quitosana aumenta a sua capacidade de adsorção comparando com a da quitina, que tem apenas uma pequena percentagem de grupos amina [40]. A quitosana exibe uma boa capacidade de adsorção para certos compostos, tais como, corantes, proteínas, iões metálicos, e outros compostos orgânicos ou inorgânicos, pois os seus grupos amina e hidroxilo podem interagir com estes compostos. Deste modo, tem sido estudada a possibilidade de se usar a quitosana para a remoção destes compostos, no tratamento de águas residuais [42]. A capacidade de adsorção da quitosana tem sido explorada também noutros âmbitos, nomeadamente, na química alimentar, para melhorar as características organoléticas de alguns alimentos (por exemplo: sumos de frutas e vinhos) [48].

De seguida serão descritas as principais interações que ocorrem entre alguns dos compostos fenólicos e iões metálicos (adsorbatos), presentes no vinho (adsorvido), e a quitosana (adsorvente) e o modo como a capacidade de adsorção deste polímero é afetado por diferentes parâmetros.

1.2.1.1. Adsorção de compostos fenólicos pela quitosana

Os grupos funcionais da quitosana, grupos hidroxilo e grupos amina, podem interagir com os compostos fenólicos do vinho maioritariamente por interações fracas (adsorção física) como ligações de hidrogénio e forças de Van der Waals. Além disso, os grupos amina provavelmente contribuem para interações iónicas com os grupos carboxílicos dos ácidos fenólicos [12].

A força iónica e o pH são fatores importantes que influenciam a adsorção de compostos fenólicos. A pH ácido, a adsorção de compostos fenólicos por adsorventes, tal como a quitosana, é superior porque os fenóis encontram-se não-dissociados e as interações de dispersão predominam. No entanto, a pH alcalino a adsorção diminui uma vez que ocorre a dissociação dos grupos hidroxilo e grupos carboxilo destes compostos [52].

Os resultados de um estudo realizado em vinhos brancos para comparação da capacidade de adsorção da quitosana em relação a outros adsorventes, tais como o caseinato de potássio e a polivinilpirrolidona (PVP), demonstraram que a quitosana tem boa afinidade para os compostos fenólicos, que são os principais componentes envolvidos nos processos oxidativos do vinho responsáveis pelo seu escurecimento. Comparando com os adsorventes convencionais, utilizados para clarificar o vinho, a eficácia dos tratamentos de vinhos com quitosana, à escala laboratorial, é menor para as classes de flavanas e proantocianidinas e igual ou maior para os hidroxycinamatos. No entanto, comparando a adsorção das diferentes classes de compostos fenólicos apenas pela quitosana, verificou-se que a percentagem de compostos pertencentes às classes de flavanas e proantocianidinas adsorvida pela quitosana foi superior à percentagem de hidroxycinamatos adsorvida por este polímero [12]. Além disso, os resultados sugerem que a quitosana não afeta negativamente as qualidades organoléticas do vinho, aparentando até originar um produto de qualidade superior [12].

1.2.1.2. Adsorção de íons metálicos pela quitosana

As interações da quitosana com íons metálicos têm sido largamente descritas [46,54,55]. Três mecanismos são geralmente citados para a explicação da adsorção do metal pela quitosana: (a) quelação de metal, (b) atração eletrostática (ou troca de íons) e (c) formação de pares iônicos. A adsorção de cátions metálicos, em soluções com pH próximo de neutro, ocorre através de interações do tipo (a); a adsorção de aniões metálicos, em soluções ácidas ocorre por interações do tipo (b); e a adsorção de alguns cátions de metais alcalinos ou alcalino-terrosos ocorre através de interações do tipo (c) [46].

Em soluções com um pH próximo de neutro, o número elevado de grupos amina no biopolímero explica a incorporação de cátions metálicos no duplete eletrónico livre do azoto. A adsorção dos cátions metálicos é, portanto, controlada pelo pH da solução: a competição de prótons reduz drasticamente a adsorção de cátions metálicos abaixo de pH 4-4,5 [46,56]. A adsorção de Fe (II) e Fe (III) aumenta com o aumento do pH da solução. Em soluções ácidas, como no caso dos vinhos, mais prótons estarão disponíveis para protonar os grupos amina, formando grupos -NH_3^+ , e reduzindo assim o número de locais de ligação para a adsorção de Fe (II) e Fe (III). Por outro lado, a pH mais elevado a adsorção de Fe (II) e Fe (III) aumenta, devido à diminuição do efeito inibitório do H^+ , que diminui com o aumento do pH. Contudo, em soluções com valores de pH superiores a 7 a precipitação de Fe (II) e Fe (III) ocorre simultaneamente [44]. No caso da adsorção de aniões metálicos, o ambiente dos grupos amina não é tão importante como é no caso da adsorção de cátions metálicos. Isto porque, o mecanismo de adsorção aniónica envolve apenas a carga eletrónica positiva do grupo amina protonado. A gama de pH ótimo para a adsorção de aniões metálicos e a estabilidade do polímero encontra-se a valores de pH entre 2 e 4 [46].

De um modo geral, a afinidade da quitosana para os íons metálicos é fortemente influenciada pelas condições ambientais das funções amina. Por conseguinte, a reticulação da quitosana com agentes que liguem ao grupo amina diminui a disponibilidade de funções amina para a quelação de cátions metálicos e com uma proporção de reticulação elevada a capacidade de adsorção diminui drasticamente [56,57].

A presença de agentes quelantes na solução é outro fator que também pode influenciar a capacidade de adsorção do polímero, bem como os mecanismos que ocorrem durante este processo. Com efeito, a complexação de cátions metálicos com ligandos pode alterar a especiação desses mesmos cátions e, em alguns casos, formar aniões metálicos que só podem ser adsorvidos em soluções ácidas, com os grupos amina protonados, através de interações iônicas [58,59].

2. ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

Muitos constituintes do vinho, incluindo compostos fenólicos, certos metais, aminoácidos, aldeídos e outros compostos, são suscetíveis de serem oxidados durante o processo de vinificação levando, como consequência, ao seu escurecimento [5]. Os processos oxidativos afetam negativamente as propriedades sensoriais dos vinhos, levando à perda de cor, sabor e aroma, e aumento de adstringência deste produto [58,59]. Assim sendo, foi necessário encontrar um método capaz de conservar o vinho, prevenindo a ocorrência de reações de oxidação-redução entre os vários componentes existentes no vinho.

O dióxido de enxofre é um dos aditivos mais versáteis e eficientes utilizados na vinificação, usado para prevenir os processos de oxidação que ocorrem no vinho, sendo utilizado com sucesso há longos anos [60]. Além da atividade antioxidante, o SO_2 tem também propriedades antimicrobianas e é igualmente importante para minimizar a polimerização fenólica, diminuindo a taxa de perda de cor durante o envelhecimento do vinho. A adição de SO_2 é, por conseguinte, um tratamento essencial na vinificação [60,61,62]. Contudo, a adição de SO_2 aos vinhos levanta objeções relacionadas com a saúde do consumidor [60,61,63]. Foi demonstrado que uma percentagem considerável de consumidores, cerca de 1% da população, apresenta intolerância ou elevada sensibilidade aos sulfitos (compostos derivados do SO_2) e este risco é maior para asmáticos (cerca de 5% dos pacientes asmáticos são sensíveis a este composto) [61]. Deste modo, as preocupações sobre os efeitos dos sulfitos resultaram em restrições regulatórias definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) e, conseqüentemente, a concentração máxima legislada de SO_2 permitida nos vinhos tem sido gradualmente reduzida [5,60,64].

Uma crescente consciência sobre a utilização de SO_2 no vinho, e suas conseqüências, criou a necessidade de reduzir ou mesmo eliminar a utilização deste composto como um agente de conservação do vinho e procurar novas estratégias alternativas. [5,60,64].

Devido às características e propriedades da quitosana, o recurso a este polímero já foi proposto como sendo uma metodologia alternativa à adição de SO_2 no vinho, onde é utilizado na forma de filmes à base de quitosana (reticulados com genipina), havendo uma patente publicada [2]. Neste sentido, é importante perceber como é que estes filmes à base de quitosana interatuam com os componentes presentes no vinho.

2.1. Objetivos do trabalho

O principal objetivo deste trabalho centrou-se no estudo das possíveis interações existentes entre alguns componentes do vinho, nomeadamente, os compostos fenólicos e o catião Fe (II) (uma vez que estes participam nas reações de oxidação-redução que nele ocorrem) e um filme à base de quitosana reticulado com genipina, a partir de soluções modelo de vinho. Como a quitosana apresenta propriedades antioxidantes e capacidade de adsorção de diferentes compostos, tentou-se perceber de que forma é que o filme de quitosana interage com os compostos mencionados anteriormente. Numa primeira fase foram realizados estudos de interações entre o filme de quitosana e três diferentes classes de compostos fenólicos (ácidos fenólicos, monómeros e oligómeros flavonóides e antocianinas), obtidas pelo fracionamento de uma amostra de vinho tinto, utilizadas separadamente. De seguida, realizaram-se os estudos de interações entre o filme de quitosana e o catião Fe (II) . Numa última fase, foram estudadas as interações entre o filme de quitosana e a fração de antocianinas e o catião Fe (II) , em simultâneo, tentando perceber de que modo é que estes compostos se comportariam. Ao longo dos diferentes estudos foram ainda variados parâmetros como a concentração de composto em estudo e a quantidade de filme de quitosana, para se tentar perceber como é que estes parâmetros afetam a interação entre os diferentes compostos utilizados e o filme à base de quitosana.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação de filmes à base de quitosana reticulados com genipina

Uma solução aquosa de quitosana 1,5 % (m/v) em ácido acético 0,1 M foi preparada por dissolução com agitação constante à temperatura ambiente durante cerca de 16 h. A esta solução, após filtrada sob vácuo num funil de placa porosa (G2), adicionou-se o plastificante, 0,75 % (m/v) de glicerol. A mistura anterior foi colocada num banho de água a 50 °C durante 10 min de modo a promover a sua homogeneização. Após arrefecimento da mistura quitosana-glicerol, adicionaram-se 250 µL de uma solução de genipina 10 % (m/v) em etanol (95 %), sob agitação constante, para obter uma concentração final de 0,05 % (m/v). Deixou-se reagir durante uma hora, desgaseificou-se e transferiram-se 31 g da solução para placas de plexiglass 12 x 12 cm (área útil de 144 cm²), de modo a manter constante a massa total de polímero por área. As placas, previamente colocadas num suporte e niveladas, foram mantidas à temperatura ambiente durante 24 horas para ocorrer a reação entre a genipina e a quitosana. Após o tempo de reação, as placas foram colocadas na estufa a 35 °C durante cerca de 16 horas para a formação do filme por evaporação do solvente [2]. O filme foi cortado em quadrados de 2 x 2 cm de dimensão, cada quadrado correspondendo a 4 cm² de área de filme (por cada face de filme), que após serem pesados foram utilizados no estudo das interações entre os diferentes compostos e o filme à base de quitosana.

3.2. Fracionamento de vinho tinto

As frações de compostos fenólicos foram obtidas por fracionamento numa coluna C18 (SUPELCO DSC-18, 60 mL) do vinho tinto, de acordo com o procedimento descrito por Sun et al. [65]. Uma amostra de 200 mL de vinho foi desalcoolizada sob vácuo e a uma temperatura inferior a 30 °C. O vinho desalcoolizado (5,0 mL) foi neutralizado com uma solução de NaOH 0,1 M (até que a cor do vinho comece a mudar de vermelho para azul). Em seguida, adicionou-se 5,0 mL de uma solução de tampão fosfato 0,2 M a pH 7,0.

A amostra de vinho desalcoholizado neutralizada foi colocada na coluna C18 (previamente ativada com 50 mL de metanol, 50 mL de água destilada e pré-condicionada com 75 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0) com um fluxo de cerca de 2 mL/min. A eluição começou com 75 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 (1/8, v/v) para eluir os ácidos fenólicos. A coluna foi lavada com 200 mL de água destilada. De seguida, prosseguiu-se a eluição com 75 mL de acetato de etilo, extraíndo maioritariamente, os monómeros e oligómeros flavonóides. As antocianinas, proantocianidinas poliméricas e outros compostos pigmentados foram eluídos com 75 mL de metanol acidificado (0,1% HCl). O conteúdo em compostos fenólicos das três frações foi determinado pelos métodos ABTS e Folin-Ciocalteu. Para quantificar cada fração foi necessário realizar, previamente, uma curva de calibração a partir de concentrações conhecidas de ácido gálico (um dos principais ácidos fenólicos presentes no vinho [15]), que variaram de 0 a 120 µg/mL, sendo a concentração de cada fração apresentada em equivalentes de ácido gálico [EqAG]. Este procedimento foi repetido várias vezes até se obterem quantidades suficientes de cada uma das frações para realizar, posteriormente, os estudos de interações entre estes compostos e o filme à base de quitosana.

A fração de ácidos fenólicos foi ainda previamente concentrada até se obter um volume inferior a 5 mL, evaporando-se o eluente num evaporador rotativo, a temperatura inferior a 40 °C. Esta fração foi depois colocada numa coluna C18 (previamente ativada com 50 mL de metanol e lavada com 50 mL de água destilada) onde foi possível remover os sais provenientes da solução de tampão fosfato a pH 7,0. Para isso, lavou-se a fração com 75 mL de água destilada acidificada, removendo-se os sais, e de seguida removeram-se os ácidos fenólicos com 75 mL de metanol acidificado.

3.3. Estudo das interações entre componentes do vinho e o filme à base de quitosana

A solução modelo de vinho foi preparada com 5,0 g/L de ácido tartárico e 10% etanol, sendo o valor de pH ajustado para 3,5 com uma solução de NaOH 4M. O pH da solução final foi ajustado, novamente, para 3,5 após a adição dos compostos em estudo, sendo o volume final de solução de 100 mL.

A solução preparada (100 mL) foi colocada em dois frascos de vidro iguais (com um volume de cerca de 100 mL). Num dos frascos (com 50 mL de solução) foi colocado o filme à base de quitosana e o outro frasco foi usado como controlo (solução sem filme). Ambas as soluções, solução com filme e solução controlo, foram analisadas periodicamente, recolhendo-se amostras ao longo do tempo. De acordo com os componentes em estudo, as amostras recolhidas foram analisadas através de diferentes métodos espectrofotométricos, nomeadamente, ABTS, Folin-Ciocalteu e *o*-Fenantrolina, que serão descritos, posteriormente, neste capítulo.

3.3.1. Estudos com o ácido cafeico

Dissolveram-se 8,0 mg (ou 6,0 mg) de ácido cafeico em 100 mL de solução modelo procedendo-se de acordo com o descrito no ponto 3.3, obtendo-se assim duas soluções de 50 mL com uma concentração de 80 µg/mL (ou 60 µg/mL) de ácido cafeico. Adicionou-se de seguida a umas dessas soluções, a quantidade de filme desejada, que variou de 4 a 20 cm² de filme (de 1 a 3 quadrados para os ensaios com 8,0 mg e de 4 a 5 quadrados para os ensaios com 6,0 mg de ácido cafeico). Após o início de cada ensaio, procedeu-se à recolha de amostras (em triplicado) de cada uma das soluções em estudo, solução com filme e solução controlo (sem filme), que foram analisadas espectrofotometricamente, através da leitura das suas absorvâncias, pelos métodos do ABTS e de Folin-Ciocalteu, ao longo do tempo.

3.3.2. Estudos com as frações de compostos fenólicos (AF, MOF, ANTOC)

Para realizar os estudos das interações entre o filme de quitosana e cada uma das três frações de compostos fenólicos (estudadas isoladamente) obtidas no ponto 3.2 evaporaram-se 200 mL de fração de ácidos fenólicos (AF), 120 mL de fração de monómeros e oligómeros flavonóides (MOF) e 35 mL de fração de antocianinas (ANTOC), por evaporação do solvente, através de um evaporador rotativo, a temperatura inferior a 40 °C até se obter um volume final de aproximadamente 2 mL. Nas frações de MOF e ANTOC foi-se substituindo os solventes (acetato de etilo e metanol acidificado, respetivamente) por um pouco de etanol.

Com cada fração devidamente concentrada, estas foram transferidas para uma solução modelo, procedendo-se de acordo com o descrito no ponto 3.3, obtendo-se assim duas soluções de 50 mL com uma concentração igual de cada uma das frações (AF, MOF, ou ANTOC). Adicionou-se de seguida a umas das soluções, 12 cm² de filme de quitosana. Quanto à fração de ANTOC, foi realizado, posteriormente, um segundo ensaio, alterando-se apenas a quantidade de filme utilizado, que aumentou para 20 cm² de filme, mantendo as restantes condições. Após o início de cada ensaio, procedeu-se à recolha de amostras (em triplicado) de cada uma das soluções em estudo, solução com filme e solução controlo (sem filme), que foram analisadas espectralmente, através da leitura das suas absorvâncias, pelos métodos do ABTS e de Folin-Ciocalteu, ao longo do tempo. Este procedimento foi repetido três vezes, obtendo-se assim três réplicas de cada um dos ensaios com as frações de AF, MOF ou ANTOC.

3.3.3. Estudos com o catião Fe (II)

Dissolveram-se 106,80 mg de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O, sulfato de ferro (II) e amónio hexa-hidratado, em 100 mL de solução modelo, procedendo-se de acordo com o descrito no ponto 3.3, obtendo-se assim duas soluções de 50 mL com uma concentração de 152,0 µg/mL de Fe (II). Adicionaram-se de seguida a umas das soluções, 12 cm² ou 20 cm² de filme de quitosana. Após o início de cada ensaio, procedeu-se à recolha de amostras (em triplicado) de cada uma das soluções em estudo, solução com filme e solução controlo (sem filme), que foram analisadas espectralmente, através da leitura das suas absorvâncias, pelo método da *o*-Fenantrolina, ao longo do tempo. Este procedimento foi repetido três vezes, obtendo-se assim três réplicas de cada ensaio.

3.3.4. Estudos com o catião Fe (II) e a fração de antocianinas em simultâneo

Dissolveram-se 106,8 mg de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O, sulfato de ferro (II) e amónio hexa-hidratado, num pouco de solução modelo. De seguida, evaporaram-se 35,0 mL de fração constituída maioritariamente por antocianinas, por evaporação do solvente, através de um evaporador rotativo, a temperatura inferior a 40 °C, até se obter um volume de aproximadamente 2 mL (foi-se substituindo o metanol acidificado por etanol).

Com a fração devidamente concentrada, esta foi transferida para a solução modelo inicial, contendo o Fe (II) dissolvido, e procedeu-se de acordo com o descrito no ponto 3.3, obtendo-se assim duas soluções de 50 mL com uma concentração igual de Fe (II) (152,0 µg/mL) e antocianinas (≈ 46 µg/mL em EqAG, pelo método de Folin-Ciocalteu). Adicionou-se de seguida a umas das soluções, 20 cm² de filme de quitosana. Realizou-se um outro ensaio em que se diminuiu a concentração de Fe (II) para 50 µg/mL (dissolvendo-se apenas 35,1 mg de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O na solução modelo), aumentou-se a concentração de antocianinas para cerca de 244 µg/mL em EqAG, pelo método de Folin-Ciocalteu (quatro vezes mais) e mantiveram-se as restantes condições. Após o início de cada ensaio, procedeu-se à recolha de amostras (em triplicado) de cada uma das soluções em estudo, solução com filme e solução controlo (sem filme), que foram analisadas espectrofotometricamente, através da leitura das suas absorvâncias, pelos métodos da *o*-fenantrolina e de Folin-Ciocalteu, ao longo do tempo. Este procedimento foi repetido três vezes, obtendo-se assim três réplicas de cada ensaio.

3.3.5. Estudo de saturação do filme de quitosana com o catião Fe (II)

Para a realização deste ensaio preparou-se uma nova solução modelo com 150 µg/mL de Fe (II). De seguida, removeu-se o filme utilizado no primeiro ensaio com Fe (II) (onde se utilizaram 12 cm² de filme), transferindo-o para 50 mL de solução contendo Fe (II), inicialmente preparada. Obteve-se assim uma solução com filme usado e outra sem filme (o controlo).

Por sua vez, as soluções das quais foram removidos os filmes (e que continham uma quantidade de Fe (II) bastante menor do que no início do ensaio por este já ter sido adsorvido pelos filmes ao longo do tempo), foram misturadas até se obter um volume de 100 mL e igualmente repartidas por duas soluções de 50 mL com igual concentração de Fe (II). Numa destas soluções adicionaram-se 12 cm² de filme de quitosana novo e na outra não (solução controlo). Após o início de cada ensaio, procedeu-se à recolha de amostras de cada uma das soluções em estudo, solução com filme e solução controlo (sem filme), no tempo 0 e passado mais de um mês, que foram analisadas espectrofotometricamente, pelo método da *o*-fenantrolina.

3.4. Determinação de compostos fenólicos pelo método do ABTS

O método do ABTS, ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), é um dos métodos espectrofotométricos mais utilizados para a avaliação da capacidade antioxidante. Neste método, o ABTS é convertido para o seu catião radical, $\text{ABTS}^{+\bullet}$, por oxidação com o persulfato de potássio, originando um cromóforo azul esverdeado, que depois é reduzido na presença de compostos dadores de hidrogénio ou de eletrões. Durante a reação de redução, o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ é convertido de novo para a sua forma neutra incolor, provocando assim uma descoloração que pode ser convertida numa percentagem de inibição do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ e que é proporcional à concentração do composto antioxidante [66,67]. A determinação do conteúdo em compostos fenólicos, ao longo do tempo, nos ensaios em que foram utilizados o ácido cafeico e as frações de compostos fenólicos extraídas do vinho, foi realizada por este método.

A solução de ABTS 7 mM foi preparada em persulfato de potássio 2,45 mM. Esta solução foi deixada a reagir no escuro, à temperatura ambiente, durante 12-16 horas para a formação do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Diluíram-se 0,5 mL da solução de $\text{ABTS}^{+\bullet}$ em 40 mL de etanol e a absorvância desta solução foi então medida a 734 nm, num espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/Vis). A concentração da solução foi ajustada de modo a se obterem valores de absorvância entre 0,7 e 0,8. A 50 μL de cada uma das soluções em estudo foi adicionado 1,00 mL de solução de $\text{ABTS}^{+\bullet}$ diluída e deixou-se a reagir durante 15 min. Foi realizado também um branco em que a amostra (50 μL) foi substituída pela solução modelo de vinho (constituída apenas por água, 10 % etanol e 5,0 g/L ácido tartárico, pH 3,5). A absorvância da amostra e do branco foi medida a 734 nm. A percentagem de inibição foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Abs. branco} - \text{Abs. amostra})}{\text{Abs. branco}} \times 100\%$$

onde *Abs. branco* é o valor da absorvância do branco e *Abs. amostra* é o valor da absorvância das soluções em estudo.

A partir da % de inibição foi calculada a concentração ($\mu\text{g/mL}$) expressa em equivalentes de ácido gálico. Para isso, realizou-se uma curva de calibração utilizando-se o ácido gálico como padrão, utilizando soluções com diferentes concentrações (0, 3, 6, 12, 18, 24 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico) em que o solvente era a solução modelo de vinho (água, 10 % etanol e 5,0 g/L ácido tartárico, pH 3,5). A curva de calibração do ácido gálico, pelo método do ABTS, encontra-se em anexo (Figura 35A), em que se obteve uma regressão linear com a seguinte equação:

$$y = 3,7632x + 2,3679$$

onde y é a % de inibição e x a concentração de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$).

3.5. Determinação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução do reagente de Folin- Ciocalteu, uma mistura de óxidos de tungstênio e molibdênio. Os isopolifosfotungstatos são incolores no estado de valência oxidado 6^+ do metal e os compostos de molibdênio são amarelos. O método consiste numa reação de oxidação rápida dos compostos fenólicos presentes na amostra utilizando, geralmente, uma solução concentrada de carbonato de sódio, o que produz uma quantidade significativa de íons fenolatos que irão reduzir os compostos do reagente de Folin (que inicialmente tinham cor amarela). Os produtos da redução dos óxidos de metal têm uma cor azul, que tem uma absorção com um máximo a 760 nm, que pode ser medida espectrofotometricamente, e é proporcional à concentração de compostos fenólicos presentes na amostra [68,69]

A 125 μL de cada uma das soluções em estudo (solução com filme e solução controlo) adicionaram-se 500 μL de água destilada e 125 μL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos, adicionaram-se 1,250 mL de uma solução de carbonato de sódio (75g/L) e 1,00 mL de água destilada. Foi realizado também um branco em que a amostra (125 μL) foi substituída pela solução modelo de vinho (constituída apenas por água, 10 % etanol e 5,0 g/L ácido tartárico, pH 3,5). Deixou-se reagir durante 30 minutos e a absorvância foi lida a 760 nm (espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis).

Através das absorvâncias medidas foi calculada a concentração dos compostos fenólicos, expressa em equivalentes de ácido gálico. Para isso, realizou-se uma curva de calibração utilizando-se o ácido gálico como padrão, utilizando soluções com diferentes concentrações (0, 18, 36, 60, 72, 90 e 120 µg/mL de ácido gálico) em que o solvente era a solução modelo de vinho (água, 10 % etanol e 5,0 g/L ácido tartárico, pH 3,5). A curva de calibração do ácido gálico, pelo método de Folin-Ciocalteu, encontra-se em anexo (Figura 35B), em que se obteve uma regressão linear com a seguinte equação:

$$y = 0,0052x + 0,0059$$

onde y é a diferença entre a absorvância medida para cada amostra e a absorvância do branco e x a concentração de ácido gálico (µg/mL).

Para determinar a concentração de ácido cafeico, nos estudos onde se utilizou este composto, procedeu-se de forma semelhante, realizando-se, no entanto, uma curva de calibração (Figura 36, em anexo) onde o ácido cafeico foi utilizado como padrão, pelo método de Folin-Ciocalteu.

3.6. Determinação de Fe (II) pelo método da *o*-fenantrolina

O método da *o*-fenantrolina baseia-se numa reação de complexação entre o Fe (II) e a *o*-fenantrolina, um agente quelante que forma complexos com metais de baixo número de oxidação. Assim sendo, o ferro contido numa solução é previamente reduzido a ião ferroso (Fe (II)) recorrendo-se para isso a um agente redutor (como por exemplo, o cloridrato de hidroxilamina) e, posteriormente, é tratado com *o*-fenantrolina. Para manter o pH ácido, utiliza-se também uma solução tampão de acetato de sódio a pH 5,5. Para cada três moléculas de fenantrolina ocorre a quelatação com um ião ferroso resultando num complexo de cor vermelho-alaranjada, com uma absorção máxima a 510 nm, que pode se medida espectralmente e é proporcional à quantidade de Fe (II) presente em solução [70,71].

A 20 µL de cada solução (com filme e controlo) adicionaram-se 200 µL de uma solução de cloridrato de hidroxilamina 10 g/L, como agente redutor, aguardando-se depois 5 minutos. De seguida, adicionaram-se também 400 µL de uma solução de *o*-fenantrolina 7

mM e 600 µL de solução tampão de acetato de sódio 0,1 M, a pH 5,5. Foi realizado também um branco em que a amostra (20 µL) foi substituída pela solução modelo de vinho (constituída apenas por água, 10 % etanol e 5,0 g/L ácido tartárico, pH 3,5). Deixou-se reagir durante 10 minutos e leu-se a absorvância a 510 nm, num espectrofotômetro (Perkin Elmer UV/Vis). Através das absorvâncias medidas foi calculada a concentração de Fe (II). Para isso, realizou-se a curva de calibração do Fe (II) pelo método da o-fenantrolina, utilizando a solução modelo como solvente, a partir das concentrações de 0, 6, 15, 30, 61, 75,122, 183, 244 e 305 µg/mL de Fe (II). A curva de calibração do Fe (II), por este método, encontra-se em anexo (Figura 37), onde se obteve uma regressão linear com a seguinte equação:

$$y = 0,0029x + 0,0166$$

onde y é a diferença entre a absorvância medida para cada amostra e a absorvância do branco e x a concentração de Fe (II) (µg/mL).

Foi ainda possível representar a % de composto adsorvido (% comp.ads.) ao longo do tempo, em cada ensaio, através da seguinte equação:

$$\% \text{ comp. ads.} = \frac{([controle] - [filme]) \times 50}{[controle] \times 50 \times 100}$$

Onde, [controle] é a concentração de composto na solução controle, [filme] é a concentração de composto na solução com filme e “50” é o volume de cada uma das soluções (50 mL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo das interações entre compostos fenólicos e o filme à base de quitosana

Os compostos fenólicos existentes no vinho são um dos principais substratos nas reações de oxidação-redução. Por isso, começou-se por estudar as possíveis interações existentes entre estes compostos e o filme à base de quitosana, que pode ser usado como conservante do vinho.

No início do trabalho foi necessário realizar alguns ensaios prévios de forma a otimizar alguns parâmetros, tais como a concentração inicial de composto e a quantidade de filme à base de quitosana a serem utilizados. Estes ensaios preliminares foram realizados utilizando um composto fenólico comercial, o ácido cafeico, um dos principais ácidos fenólicos presentes no vinho [72] e, portanto, um componente representativo dos compostos fenólicos.

4.1.1. Estudos com o ácido cafeico

No estudo da interação do filme de quitosana com ácido cafeico foram utilizadas diferentes concentrações de ácido cafeico (80 $\mu\text{g/mL}$ e 60 $\mu\text{g/mL}$) em solução modelo de vinho (constituída por 10 % de etanol e ácido tartárico 5g/L, a pH 3,5), e também diferentes quantidades de filme em solução (de 4 a 20 cm^2 por cada face do filme).

Nos ensaios com 80 $\mu\text{g/mL}$ de ácido cafeico e em que se utilizou 4 cm^2 e 8 cm^2 de filme, observaram-se variações de concentração de ácido cafeico muito pequenas ao longo do tempo e os métodos utilizados para a determinação deste composto não foram sensíveis a essas variações da sua concentração. Estes resultados não foram conclusivos e poderão indicar que se utilizou uma quantidade muito pequena de filme de quitosana em relação à quantidade de ácido cafeico presente em solução. Assim sendo, iniciou-se um novo ensaio, representado na Figura 9, mantendo-se a concentração de ácido cafeico e aumentando a quantidade de filme para 12 cm^2 .

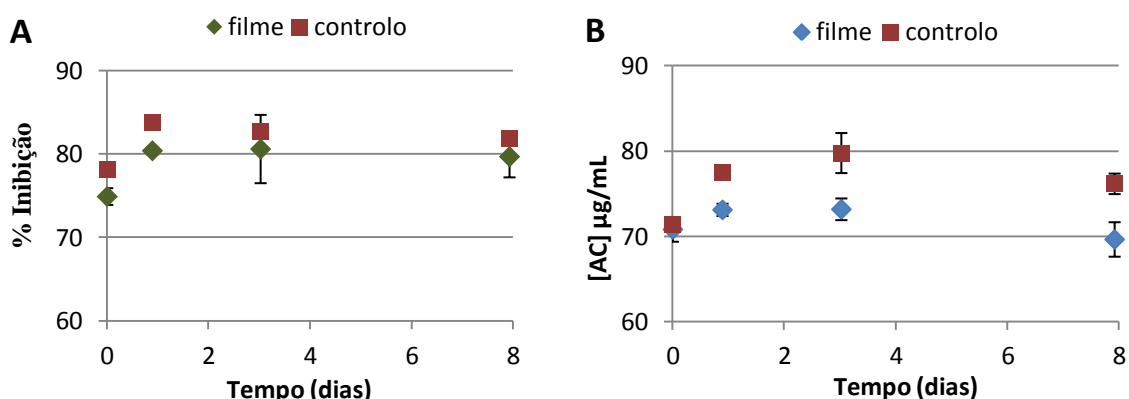


Figura 9. Evolução da concentração de ácido cafeico em solução modelo de vinho, ao longo de 8 dias, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (12 cm²) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Pelos gráficos apresentados na Figura 9 observa-se que pelo método do ABTS, não existe diferença significativa de percentagem de inibição entre a solução controlo (sem filme) e a solução com filme, ao longo do tempo. No entanto, pelo método de Folin, verifica-se que com o passar do tempo vai surgindo uma ligeira diferença entre a concentração do ácido cafeico na solução controlo e na solução com filme, que ao fim de 8 dias já é igual a cerca de 6 µg/mL de ácido cafeico. Como foi possível ver alguma diferença entre a solução controlo e com filme nestas condições (80 µg/mL de ácido cafeico e 12 cm² de filme), realizou-se um ensaio em que se alteraram tanto a concentração de ácido cafeico, como a quantidade de filme, para perceber de que modo é que a alteração destes parâmetros afetaria a evolução da concentração do composto fenólico, ao longo do tempo. Desta forma, foi realizado ensaio com 60 µg/mL de ácido cafeico e 16 cm² de filme apresentado na Figura 10.

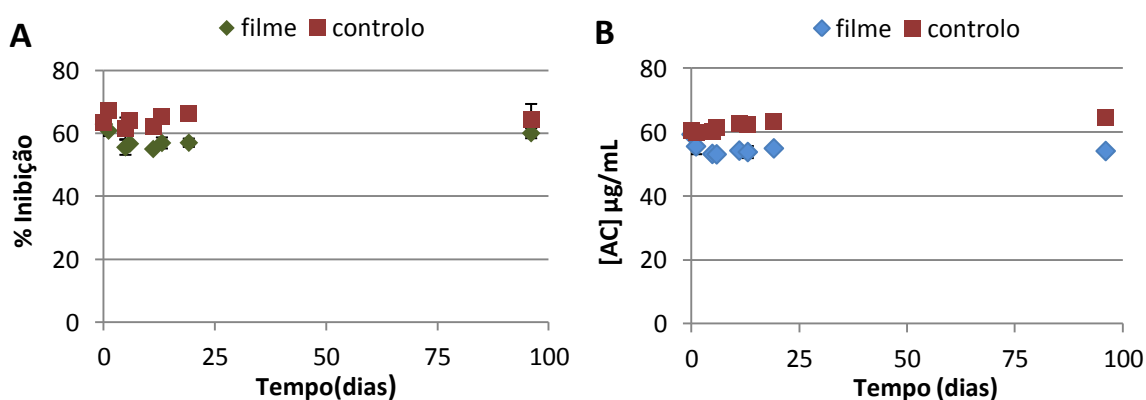


Figura 10. Evolução da concentração de ácido cafeico em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (16 cm²) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Tanto no gráfico A, obtido pelo método do ABTS, como no gráfico B, obtido pelo método de Folin-Ciocalteu, da Figura 10, verifica-se que na solução controlo a concentração do ácido cafeico vai-se mantendo ao longo do tempo, enquanto que na solução com filme, a concentração deste composto vai diminuindo. Ao fim de 20 dias, as diferenças entre a solução controlo e a solução modelo foram de cerca de 9 % de inibição e cerca de 8 $\mu\text{g/mL}$ de ácido cafeico, pelos métodos A e B, respetivamente, diferenças estas que, após cerca de 100 dias de ensaio, se foram mantendo. Em comparação com o ensaio anterior (80 $\mu\text{g/mL}$ de ácido cafeico e 12 cm^2 de filme), verifica-se que quando se diminuiu a concentração de ácido cafeico e se aumentou a quantidade de filme, existiu uma maior diferença de concentração deste composto entre a solução controlo (sem filme) e a solução com filme de quitosana.

Um outro ensaio preliminar foi realizado onde se manteve a concentração de ácido cafeico (60 $\mu\text{g/mL}$) e se aumentou a quantidade de filme de quitosana para 20 cm^2 (Figura 11), para estudar a influência da quantidade de filme na concentração do ácido cafeico, ao longo do tempo. Em ambos os gráficos A e B, verifica-se que, à semelhança do que aconteceu no ensaio representado pela Figura 10, na solução controlo (sem filme) a concentração de ácido cafeico manteve-se constante ao longo do tempo e na solução com filme a concentração deste composto foi diminuindo ao longo do tempo.

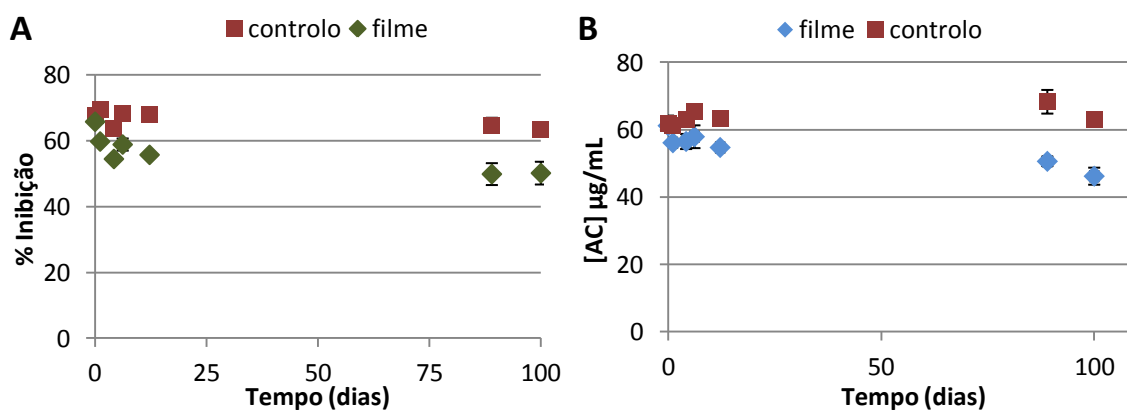


Figura 11. Evolução da concentração de ácido cafeico em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (20 cm^2) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Assim, a evolução da concentração de ácido cafeico, ao longo do tempo, entre as soluções controle e com filme, correspondeu a uma diferença na percentagem de inibição de cerca de 13 % pelo método do ABTS, e a uma diferença na concentração deste composto de cerca de 17 µg/mL pelo método de Folin-Ciocalteu, após 100 dias decorridos de ensaio. Estes valores, como são superiores aos obtidos no ensaio anterior (9 % e 8 µg/mL, pelos métodos A e B, respetivamente), indicam ainda que um aumento na quantidade de filme de quitosana leva a uma maior diminuição da concentração de ácido cafeico na solução com filme, ao longo do tempo.

De um modo geral, nestes primeiros ensaios verificou-se que existiu interação entre o ácido cafeico e o filme à base de quitosana, o que se traduziu numa diferença de % de inibição do radical ABTS^{••} (método A) e numa diferença de concentração deste composto fenólico (método B) entre a solução controle e a solução com filme ao longo do tempo. Na solução controle a concentração de ácido cafeico manteve-se constante ao longo do tempo, enquanto que na solução com filme a concentração diminuiu ao longo do tempo. Mais ainda, pelos resultados apresentados anteriormente verifica-se que essa interação ocorre logo nos primeiros dias (e até mesmo no primeiro dia) após o início de cada ensaio. Para além de se verificar a existência de interação entre o ácido cafeico e o filme de quitosana, e uma vez que se variou tanto a concentração deste composto fenólico (60 ou 80 µg/ml), como a quantidade de filme utilizada (de 4 a 20 cm² de filme), estes ensaios preliminares permitiram ainda determinar a quantidade mínima necessária de filme a ser utilizada nos estudos seguintes. Assim sendo, todos os estudos foram realizados com pelo menos 12 cm² de filme de quitosana.

Uma vez verificada a interação entre este composto fenólico (ácido cafeico) e o filme de quitosana, foi feito o fracionamento de uma amostra de vinho tinto, tendo-se obtido três frações distintas de compostos fenólicos que foram depois utilizadas no estudo de interação entre estes compostos e o filme de quitosana.

4.1.2. Compostos fenólicos extraídos do vinho tinto

Uma amostra de vinho tinto foi fracionada nos seus diferentes extratos de compostos fenólicos recorrendo-se para isso a diferentes eluentes e a uma fase estacionária C18. Com uma solução tampão de fosfato (pH 7) obteve-se uma primeira fração de compostos fenólicos constituídos, maioritariamente, por ácidos fenólicos (AF). De seguida, usando acetato de etilo como eluente, obteve-se uma segunda fração, constituída, maioritariamente, por monómeros e oligómeros flavonóides (MOF) e, por fim, foi obtida uma terceira fração de compostos fenólicos constituída, maioritariamente, por antocianinas (ANTOC) e que foram eluídos com metanol acidificado. Na Figura 12 observa-se o espectro UV/Visível dos três extratos de compostos fenólicos obtidos, no intervalo de comprimento de onda compreendido entre os 250 nm e os 700 nm.

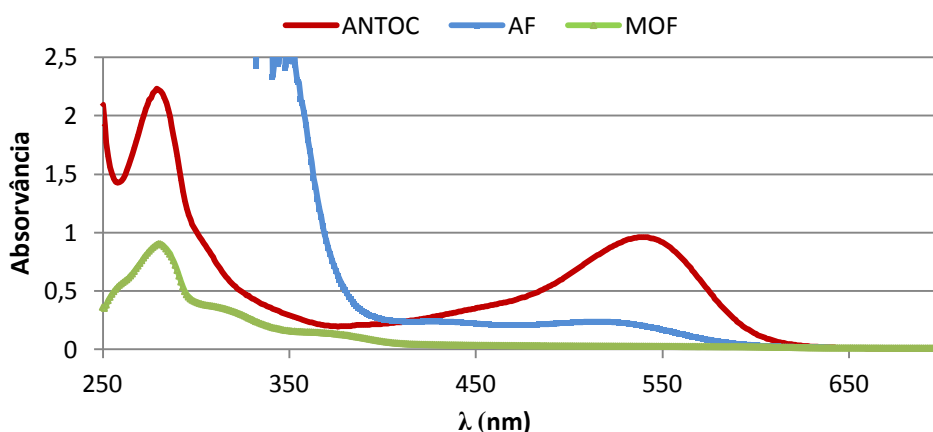


Figura 12. Espectro UV/Visível, obtido entre os 250 e os 700 nm, das frações de compostos fenólicos obtidos pelo fracionamento do vinho tinto: extrato de ácidos fenólicos (AF), extrato de monómeros e oligómeros flavonóides (MOF) e extrato de antocianinas (ANTOC).

A partir do espectro UV/Vis verifica-se que o espectro da fração obtida com metanol acidificado (constituída maioritariamente por antocianinas) apresenta duas bandas de absorção, uma com o máximo de absorção a cerca de 535 nm, na zona do visível, e a outra a cerca de 275 nm, na zona ultravioleta. Quanto às outras duas frações, a fração dos MOF apresenta apenas uma banda com o máximo de absorção na zona do ultravioleta, a cerca de 275 nm, que coincide com a banda das antocianinas, e a fração dos AF apresenta um forte absorção também na zona do ultravioleta, abaixo dos 400 nm.

Estes resultados estão de acordo com a literatura, onde é descrito que os flavonóides mostram alta absorvância na faixa de 250 a 270 nm (região UV) e que, para além disso, as antocianinas têm também uma intensa absorção na faixa de 520 a 560 nm (região do visível). A absorção UV dos compostos fenólicos pode ser atribuída ao anel benzénico e a absorção visível das antocianinas deve-se à deslocalização de eletrões entre os três anéis destes compostos fenólicos [73,74].

Após a quantificação de cada fração, pelo método do ABTS e em equivalentes de ácido gálico, a fração de AF teve uma concentração correspondente a cerca de 128 µg/mL de vinho, a fração de MOF teve uma concentração correspondente a cerca de 256 µg/mL de vinho e a fração de ANTOC teve uma concentração correspondente a cerca de 560 µg/mL de vinho. Como as frações obtidas existem em diferentes proporções no vinho tinto, os estudos das interações entre os compostos fenólicos obtidos (AF, MOF, ANTOC) e o filme de quitosana foram realizados partindo-se de diferentes concentrações iniciais de cada fração, tentando deste modo fazer uma aproximação às quantidades destes compostos existentes no vinho. Os ensaios com as diferentes frações de compostos fenólicos foram realizados, separadamente, utilizando-se 12 cm² de filme à base de quitosana em cada ensaio.

4.1.3. Estudo com a fração de ácidos fenólicos

Após a obtenção e quantificação dos três extratos de compostos fenólicos deu-se início aos ensaios de estudo das interações entre estes diferentes compostos presentes no vinho e o filme constituído à base de quitosana.

Um dos ensaios foi realizado com a fração constituída, maioritariamente, por ácidos fenólicos e está representado pela Figura 13. Pelos resultados obtidos, verifica-se que, por um lado, a concentração de AF se vai mantendo constante ao longo do tempo na solução controlo e que, por outro, vai diminuindo na solução com filme, acabando por se manter constante ao fim de aproximadamente 20 dias de ensaio decorrido, sendo esta diminuição equivalente a cerca de 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ de AF (em equivalentes de AG), pelos métodos A e B, respetivamente. Na Figura 13 B é ainda possível visualizar que passados cerca de 3 meses (94 dias) esta diferença entre a solução controlo e a solução com filme é ainda mantida. Deste modo, observa-se que, tal como acontecera com os ensaios preliminares usando o ácido cafeico, também existiu interação entre os compostos presentes nesta fração de ácidos fenólicos e o filme de quitosana.

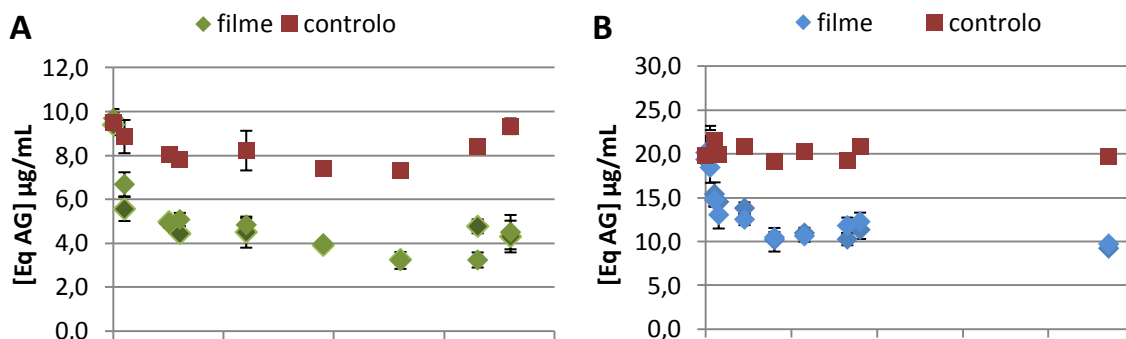


Figura 13. Evolução da concentração de AF em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (12 cm^2) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

A partir dos resultados obtidos foi possível expressar a percentagem de composto adsorvido pelo filme ao longo do tempo (Figura 14). Pelos gráficos obtidos verifica-se que a adsorção dos AF pelo filme de quitosana foi mais rápida nos primeiros dias, onde cerca de 40 % dos compostos são adsorvidos nos primeiros 15 dias, tornando-se mais lenta com o passar do tempo, até que se mantém constante, atingindo um equilíbrio.

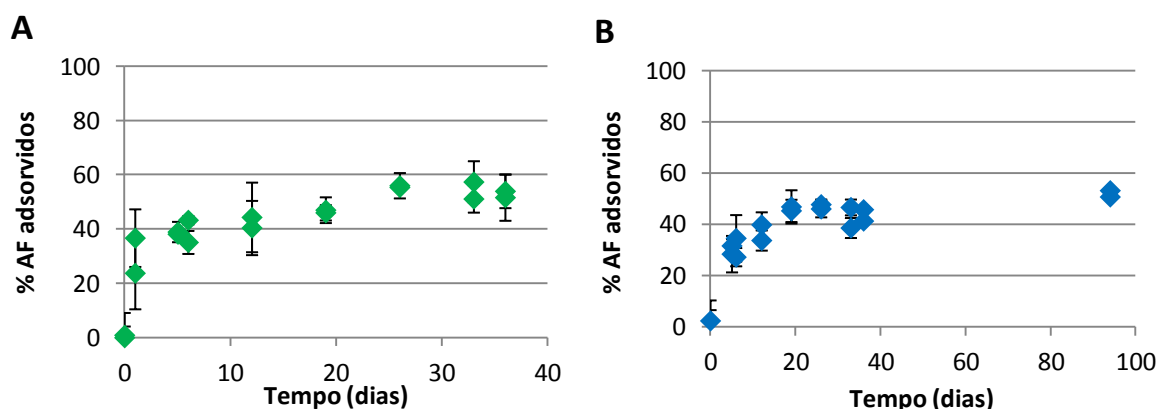


Figura 14. Estudo com a fração de AF, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de AF adsorvidos pelo filme ao longo do tempo, pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Observa-se ainda que os valores da percentagem máxima de composto adsorvido, no equilíbrio, obtidos pelos dois métodos utilizados (ABTS e Folin-Ciocalteu) são semelhantes, correspondendo a cerca de 53%.

Na Figura 15 está representada a quantidade de composto adsorvida nos primeiros dias de ensaio (até ao dia 20, aproximadamente), onde ocorre uma maior adsorção do composto. Para determinar a cinética da interação entre os AF e o filme de quitosana foi calculada a linha de tendência, através de uma regressão linear, para os dados obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu. Pela equação obtida da regressão linear, verifica-se que o declive da reta é de $9,5 \pm 2,0$ (µg/dias).

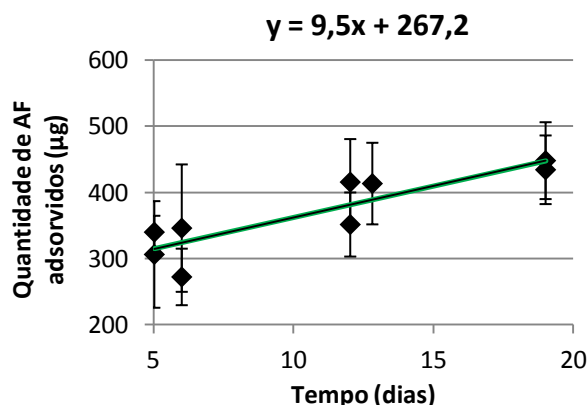


Figura 15. Linha de tendência adicionada aos dados do estudo com a fração de AF, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de AF adsorvidos pelo filme nos primeiros 5 a 20 dias, pelo método de Folin-Ciocalteu.

Com os dados obtidos neste ensaio foi ainda possível determinar-se a quantidade máxima de composto adsorvido por cm^2 de filme à base de quitosana. Nos últimos dias de ensaio, quando já foi atingido o equilíbrio, verifica-se que os valores máximos de AF adsorvidos pelo filme foram de $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e de $42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, pelo método do ABTS e pelo método de Folin, respetivamente.

4.1.4. Estudo com a fração de monómeros e oligómeros flavonóides

Depois de iniciado o ensaio com a fração de AF, realizou-se o ensaio com a fração constituída, principalmente, por monómeros e oligómeros flavonóides (MOF), representado na Figura 16. Tal como nos ensaios anteriores, também se observa que, tanto pelo método do ABTS, como pelo método de Folin-Ciocalteu, a concentração da fração de MOF foi-se mantendo constante ao longo do tempo na solução controlo (cerca de $16 \mu\text{g}/\text{mL}$, pelo método A e cerca de $36 \mu\text{g}/\text{mL}$ pelo método B) e foi decrescendo na solução com filme (até cerca de $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ pelo método A e até cerca de $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ pelo método B). Com esta diferença de concentração entre a solução controlo e a solução com filme, ao longo do tempo, verifica-se que existiu interação entre a fração de MOF e o filme constituído à base de quitosana.

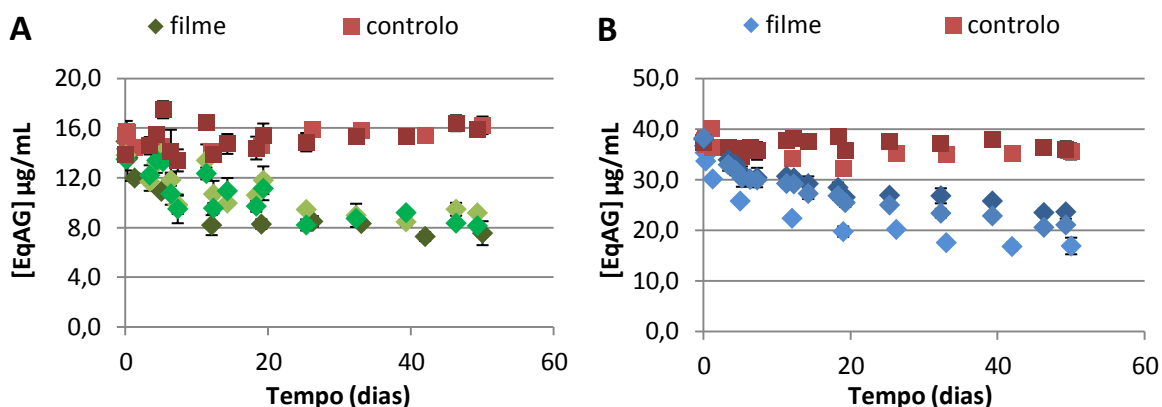


Figura 16. Evolução da concentração de MOF em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (12 cm^2) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Na Figura 17 são apresentados os resultados destes ensaios com a fração de MOF expressos em percentagem de composto adsorvido pelo filme de quitosana, ao longo do tempo. Pelos gráficos apresentados verifica-se que estes dados mostram uma tendência ao longo do tempo que aparenta ser semelhante à tendência exibida pelos ensaios com a fração de AF. Uma outra semelhança visível entre estes ensaios, com a fração de MOF, e os ensaios anteriores, com a fração de AF, é a percentagem máxima de composto adsorvido pelo filme de quitosana que nos últimos dias correspondeu a cerca de 53 % tanto pelo método A, como pelo método B.

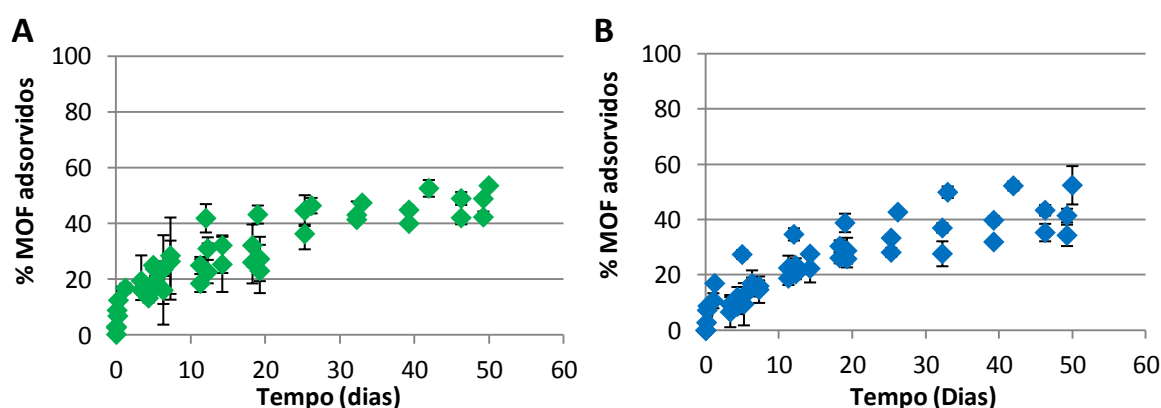


Figura 17. Estudo com a fração de MOF, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de MOF adsorvidos pelo filme ao longo do tempo, pelo método (A) do ABTS e pelo método (B) de Folin- Ciocalteu.

Contudo, e apesar de visualmente se identificarem algumas semelhanças entre os ensaios realizados com as duas primeiras frações de compostos fenólicos (AF e MOF), os resultados da Figura 18, que representam os dados relativos à quantidade de composto (µg) adsorvida pelo filme ao longo do tempo (entre os dias 5 e 20 de ensaio decorrido) e aos quais foi traçada uma linha de tendência, demonstram que há diferenças na interação entre o filme de quitosana e as duas diferentes frações, no mesmo intervalo de tempo. Pela equação da linha de tendência obtida por regressão linear, observa-se que o declive corresponde a $21,4 \pm 2,5$ µg/dias, que é superior em comparação com o declive obtido para a fração de AF (onde $m = 9,5 \pm 2,0$ µg/dias). Estes resultados poderão indicar que a velocidade com que ocorre a interação entre os MOF e o filme de quitosana é superior à velocidade com que ocorre a interação entre a mesma quantidade de filme (12 cm²) e os AF, durante o mesmo período de tempo.

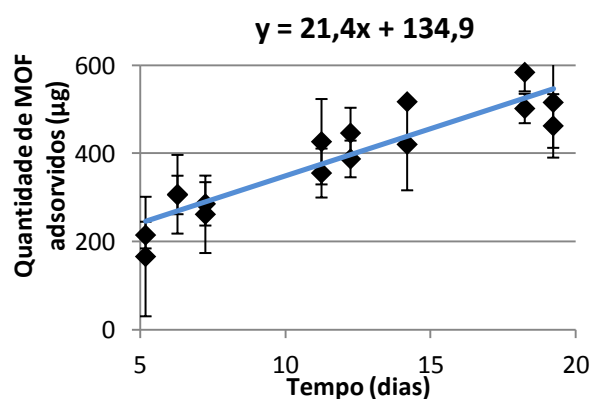


Figura 18. Linha tendência adicionada aos dados do estudo com a fração de MOF, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de MOF adsorvidos pelo filme nos primeiros 5 a 20 dias, pelo método de Folin- Ciocalteu.

Decorridos 50 dias de ensaio foi possível determinar a quantidade máxima de MOF que foi adsorvida (em média) por cada cm² de filme de quitosana correspondendo esse valor a cerca de 32 µg/cm² e a cerca de 63 µg/cm², pelo método do ABTS e pelo método de Folin-Ciocalteu, respetivamente. Em comparação com os valores obtidos com a fração de AF (cujos valores correspondem a 20 µg/cm² e 42 µg/cm², pelos métodos A e B, respetivamente) verifica-se que os valores obtidos com esta fração (MOF) são superiores. No entanto, é de salientar que os ensaios com a fração de AF foram iniciados com uma concentração inferior (cerca de 10 µg/mL e de 20 µg/mL, pelos métodos A e B, respetivamente) à concentração inicial de MOF (cerca de 16 µg/mL e de 36 µg/mL, pelos métodos A e B, respetivamente).

4.1.5. Estudo com a fração de antocianinas

O ensaio realizado entre a fração de ANTOC e o filme de quitosana está representado na Figura 19, onde se verifica que também existiu interação entre os compostos presentes nesta fração e o filme. Ao longo do tempo, observa-se que a concentração de ANTOC se vai mantendo constante, enquanto que a concentração desta fração na solução com filme vai diminuindo. Nos últimos dias de ensaio a diferença de concentração de ANTOC entre a solução controlo e a solução com filme é de cerca de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ (pelo método A) e mais de 17,5 $\mu\text{g/mL}$ (pelo método B).

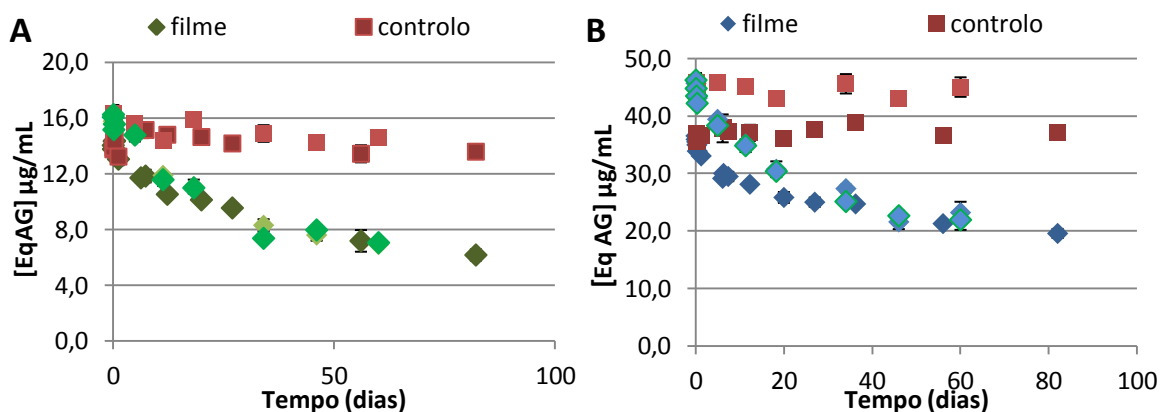


Figura 19. Evolução da concentração de ANTOC em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (12 cm^2) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

O primeiro ensaio relativo ao estudo das interações entre a fração de ANTOC e o filme de quitosana (representado pelas séries com cores mais escuras) foi iniciado com uma concentração de ANTOC de cerca de 14 $\mu\text{g/mL}$ em eqAG (método A) ou 37 $\mu\text{g/mL}$ em eqAG (método B), inferior à concentração de ANTOC com que se iniciaram os outros dois ensaios (cerca de 16 $\mu\text{g/mL}$ em eqAG, pelo método A e cerca de 45 $\mu\text{g/mL}$ em eqAG, pelo método B).

Na Figura 20, onde é expressa a percentagem de composto adsorvido pelo filme de quitosana ao longo do tempo, verifica-se que ao fim de 60 dias (2 meses) é atingida a % máxima de ANTOC adsorvida pelo filme, que corresponde a cerca de 52 % de composto adsorvido, pelo método A e pelo método B.

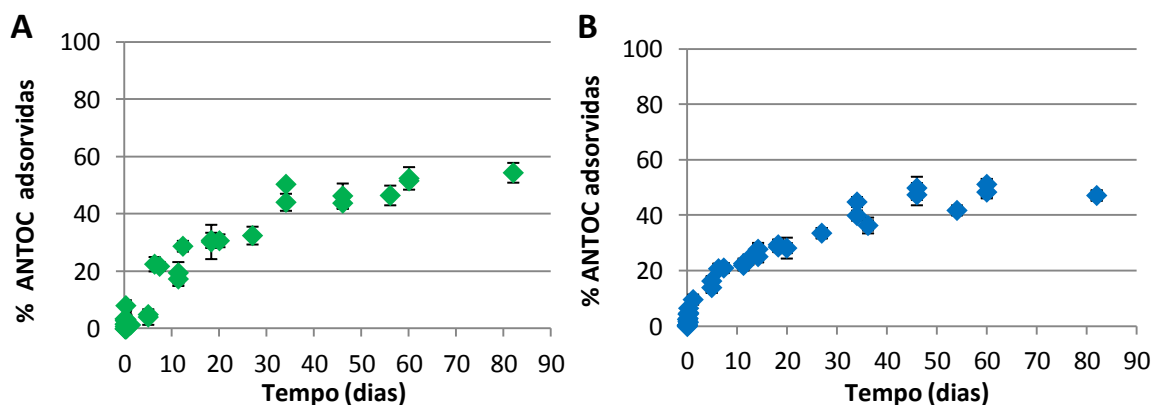


Figura 20. Estudo com a fração de ANTOC, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de ANTOC adsorvidas pelo filme ao longo do tempo, pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin- Ciocalteu.

Em comparação com as frações anteriores, verifica-se que também nesta fração mais de 50% dos compostos são adsorvidos pelos 12 cm² de filme de quitosana utilizados.

Na Figura 21, onde foi calculada a linha de tendência, através de uma regressão linear, para os dados que expressam a quantidade de composto adsorvido (µg) pelo filme, ao longo do tempo, obteve-se uma equação da reta cujo valor do declive é igual a $17,7 \pm 4,1$ µg/dias. Tendo em conta o erro-padrão, pode dizer-se que este valor é semelhante ao declive da reta obtido no ensaio anterior (MOF: $m = 21,4 \pm 2,5$), o que indica que a velocidade de interação entre a fração de ANTOC e o filme poderá ser semelhante à da interação entre a fração de MOF e o filme de quitosana.

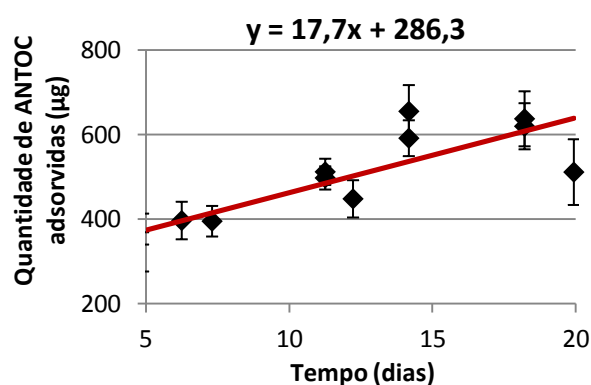


Figura 21. Linha tendência adicionada aos dados do estudo com a fração de ANTOC, utilizando 12 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de ANTOC adsorvidas pelo filme durante os primeiros 20 dias, pelo método de Folin- Ciocalteu.

Quanto ao valor da quantidade máxima de ANTOC adsorvida pelo filme, ao fim de 60 dias, este corresponde a cerca de $32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e a cerca de $93 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, pelo método A e pelo método B, respetivamente, mas apenas para os ensaios iniciados com uma maior concentração de ANTOC (réplicas 2 e 3). Os respetivos valores correspondentes ao primeiro ensaio (cerca de $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e a cerca de $73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, pelo método A e pelo método B, respetivamente, ao fim de 82 dias) são inferiores pois, o ensaio foi iniciado com uma concentração mais baixa de ANTOC. Assim sendo, pode comprovar-se que, tal como referido na literatura, a concentração de adsorbato na solução influencia, de facto, a interação entre estes compostos e o filme de quitosana (adsorvente) [52].

Realizados os ensaios utilizando 12 cm^2 de filme à base de quitosana, realizaram-se novos ensaios com esta fração, testando-se uma nova quantidade de filme de quitosana, que foi aumentada para 20 cm^2 , e mantando-se as restantes condições para tentar perceber de que modo é que esta alteração afetaria a interação entre as ANTOC e o filme de quitosana. Na Figura 22 encontram-se os gráficos que representam estes novos ensaios pelos métodos do ABTS (A) e Folin-Ciocalteu (B), observando-se mais uma vez, e tal como já era esperado, que existiu interação entre a fração de ANTOC e o filme de quitosana, sendo visível a diferença de concentrações entre a solução controlo e a solução com filme, ao longo do tempo.

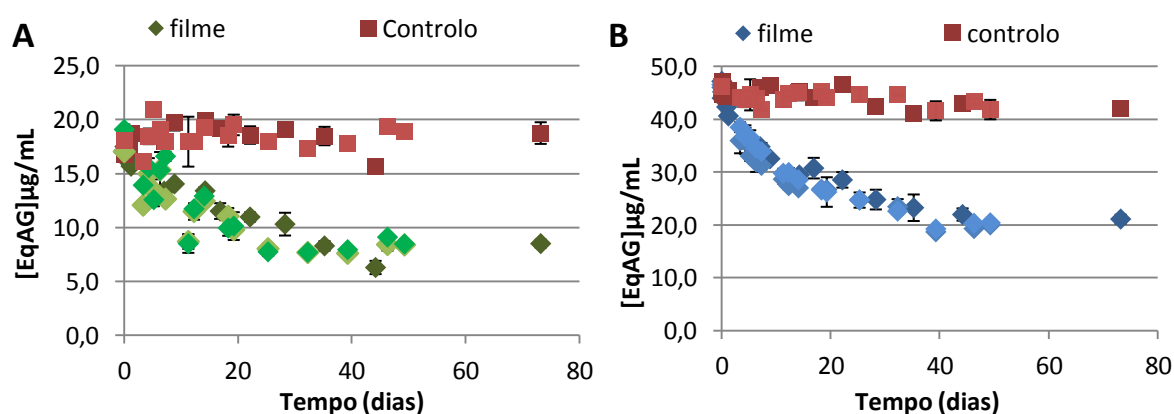


Figura 22. Evolução da concentração de ANTOC em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (20 cm^2) pelo (A) método do ABTS e (B) método de Folin-Ciocalteu.

Pela Figura 23, onde são apresentados os gráficos A (método do ABTS) e B (método de Folin-Ciocalteu) que expressam a percentagem de composto adsorvido pelo filme de quitosana ao longo do tempo, verifica-se que a disposição dos dados ao longo do tempo demonstra uma tendência parecida com as tendências observadas nos ensaios anteriores. Nos primeiros dias de ensaio foi quando ocorreu a adsorção, pelo filme, de uma grande parte dos compostos presentes em solução, verificando-se que cerca de 40 % das ANTOC foram adsorvidas nos primeiros 20 dias. Nos últimos dias de ensaio, onde a percentagem de composto adsorvido se vai mantendo constante, consegue-se determinar a percentagem máxima de ANTOC adsorvida pelo filme que corresponde a cerca de 52 % de composto adsorvido. Valor semelhante ao obtido no ensaio anterior, onde foi usado apenas 12 cm² de filme e foi adsorvida a mesma percentagem máxima de composto (52%).

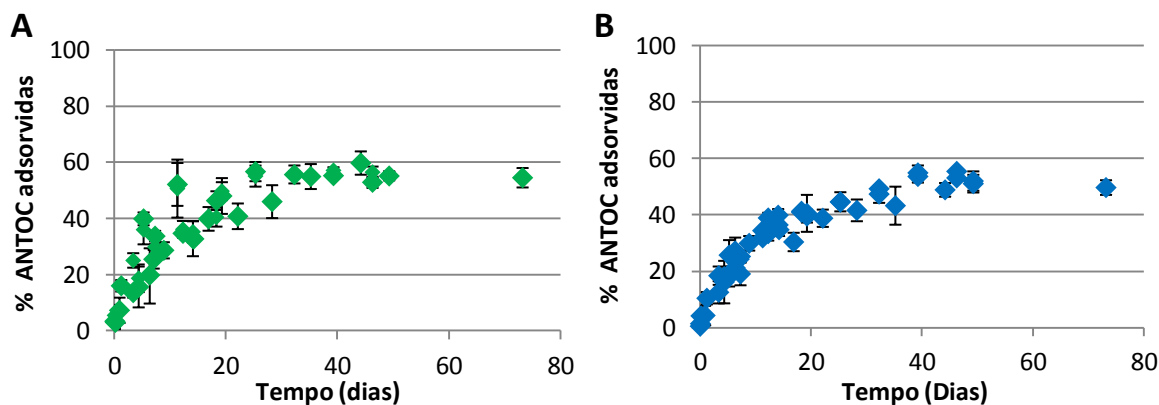


Figura 23. Estudo com a fração de ANTOC, utilizando 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de ANTOC adsorvidas pelo filme ao longo do tempo, pelo (A) método do ABTS e (B) pelo método de Folin- Ciocalteu.

Apesar da % final de ANTOC ser semelhante em ambos os ensaios (com 12 cm² e com 20 cm² de filme de quitosana), pelo gráfico da Figura 24, onde foi adicionada uma linha de tendência aos dados que representam a quantidade (µg) de composto adsorvido ao longo do tempo, entre o dia 5 e 20 do ensaio, verifica-se que o declive da reta (m) obtida por regressão linear, cujo valor corresponde a $31,3 \pm 3,6$ µg/dias é superior ao declive obtido no ensaio anterior ($m = 17,7 \pm 4,1$ µg/dias). Estes valores demonstram que a velocidade da interação entre as ANTOC e o filme de quitosana aumentou com o aumento da quantidade de filme.

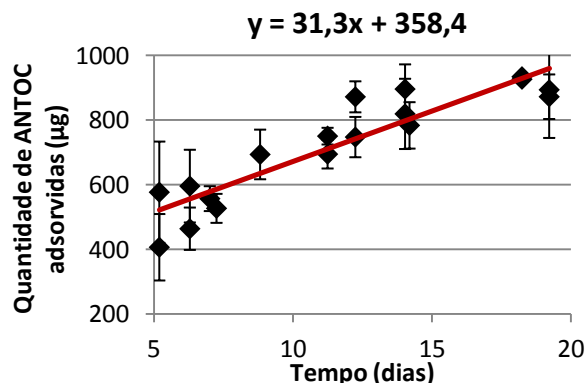


Figura 24. Linha tendência adicionada aos dados do estudo com a fração de ANTOC, utilizando 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de ANTOC adsorvidas pelo filme durante os primeiros 20 dias, pelo método de Folin-Ciocalteu.

Em relação à massa de ANTOC adsorvida por cm² de filme de quitosana, ao longo do tempo, determinou-se que a quantidade máxima de composto adsorvido pelo filme foi de aproximadamente 26 µg/cm² pelo método A e de 59 µg/cm² pelo método (B), valores estes que são inferiores aos valores obtidos no ensaio anterior, onde por cada cm² de filme foram adsorvidos 32 µg e 93 µg de ANTOC, pelos métodos A e B, respetivamente. Assim sendo, e tendo em conta que à exceção da quantidade de filme, todas as outras condições do ensaio foram mantidas, estes resultados indicam que a quantidade de composto não adsorvido presente na solução já era demasiado baixa, tornando-se a interação com o filme mais lenta, não sendo assim perceptíveis as pequenas variações de concentração de ANTOC na solução com filme. Para além disso, e provavelmente pelo mesmo motivo, esperava-se que com o aumento da quantidade de filme de quitosana aumentasse também a percentagem máxima de ANTOC adsorvida pelo filme.

De um modo geral, em todos os ensaios foi notória a existência de interação entre os diferentes compostos fenólicos (AF, MOF e ANTOC) e o filme à base de quitosana, à semelhança do que aconteceu noutros estudos entre estes compostos e a quitosana não modificada [12,52]. Verificou-se ainda que a velocidade da interação com o filme de quitosana aparenta ser semelhante entre as frações de MOF e ANTOC, sendo, no entanto, mais rápida em comparação com a fração de AF, o que também está em consonância com o referenciado na literatura onde se verificou que a quitosana apresentou maior afinidade para as classes de flavanas e proantocianidinas (presentes nas frações de MOF/ANTOC) e menor afinidade para a classe de hidroxycinamatos (presentes na fração de AF) [12].

4.2. Estudo das interações entre o catião Fe (II) e o filme à base de quitosana

4.2.1. Estudos com o catião Fe (II)

O estudo das interações entre o catião Fe (II) e o filme de quitosana foi realizado pois, tal como já foi referido, o Fe (II) é um dos cátions metálicos responsáveis por catalisar as reações de oxidação-redução que ocorrem no vinho [8].

Na Figura 25A é representado o ensaio realizado com o Fe (II) onde, tal como nos ensaios com as frações de compostos fenólicos, foi utilizado 12 cm² de filme de quitosana e a concentração inicial de Fe (II) em ambas as soluções (controlo e com filme) foi de 152 µg/mL. Pelo gráfico A da figura observa-se que a concentração de Fe (II) se mantém constante ao longo do tempo na solução controlo e que a concentração de Fe (II) na solução com filme decresce ao longo do tempo, atingindo valores inferiores a 50 µg/mL de Fe (II) em solução. Este decréscimo da concentração do composto na solução com filme é bastante acentuado logo nos primeiros dias, sendo perceptível nas primeiras 24 horas do ensaio. Com o passar do tempo, a diminuição de Fe (II) na solução com filme vai-se tornando mais lenta e decorridos cerca de 20 dias de ensaio torna-se estável, atingindo-se assim um estado de equilíbrio entre a quantidade de Fe (II) adsorvido no filme e a quantidade de Fe (II) em solução.

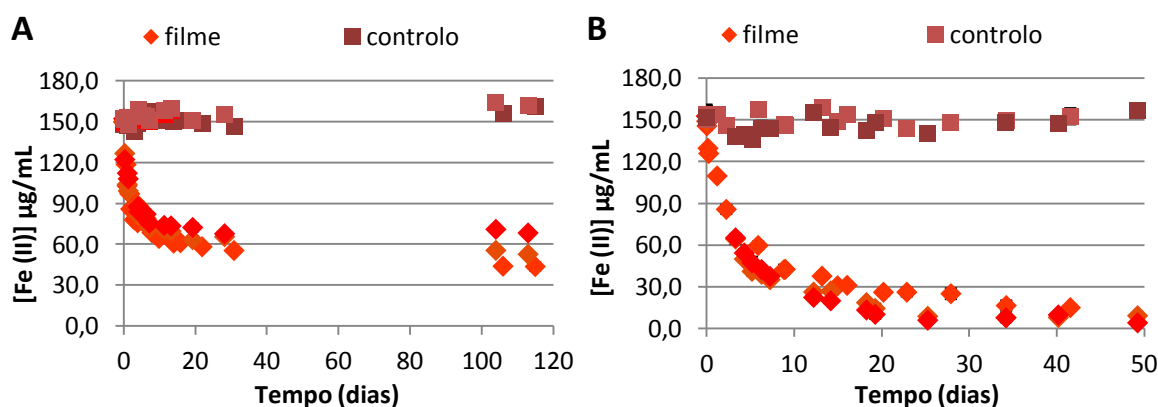


Figura 25. Evolução da concentração de Fe (II) em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana, pelo método da *o*-fenantrolina, utilizando: (A) 12 cm² e (B) 20 cm² de filme de quitosana.

Se nos estudos anteriores se observou uma tendência semelhante entre as três diferentes frações de compostos fenólicos, este primeiro ensaio com o Fe (II), por sua vez, apresentou um comportamento distinto, observando-se um decréscimo abrupto da concentração do composto em estudo, na solução com filme. Para perceber se este comportamento se mantinha, fez-se um novo ensaio com o Fe (II), aumentando a quantidade de filme de quitosana para 20 cm² e mantendo-se as restantes condições, ensaio este que é apresentado na Figura 25B. Tal como no gráfico A da Figura 25 (onde se utilizou 12 cm² de filme de quitosana) verifica-se um decréscimo acentuado da concentração de Fe (II) na solução com filme, sendo que a principal diferença que se observa entre estes dois ensaios é que, no ensaio B, com o aumento da área de filme, o Fe (II) inicialmente presente na solução é adsorvido quase na sua totalidade. Assim sendo, verifica-se que a existência de interação entre o filme de quitosana e este composto é bem evidente em ambos os ensaios, o que está em concordância com o descrito na literatura, onde é referido que a quitosana tem boa afinidade para este catião metálico [46].

Na Figura 26 são apresentados os gráficos A e B que expressam a percentagem de composto (Fe (II)) adsorvido ao longo do tempo nos ensaios com 12 cm² e 20 cm² de filme, respetivamente. Em ambos os gráficos observa-se um aumento rápido da % de Fe (II) adsorvido no filme de quitosana nos primeiros dias de ensaio, onde em apenas 5 dias mais de 40 % (gráfico A) e mais de 60 % (gráfico B) do composto foi adsorvido pelo filme. Com o decorrer do tempo, e atingido o equilíbrio, foi então possível determinar a percentagem máxima de composto adsorvido em cada ensaio, o que corresponde a cerca de 70 % de Fe (II) adsorvido no ensaio usando 12 cm² de filme (A) e a cerca de 97 % de Fe (II) adsorvido no ensaio usando 20 cm² de filme (B).

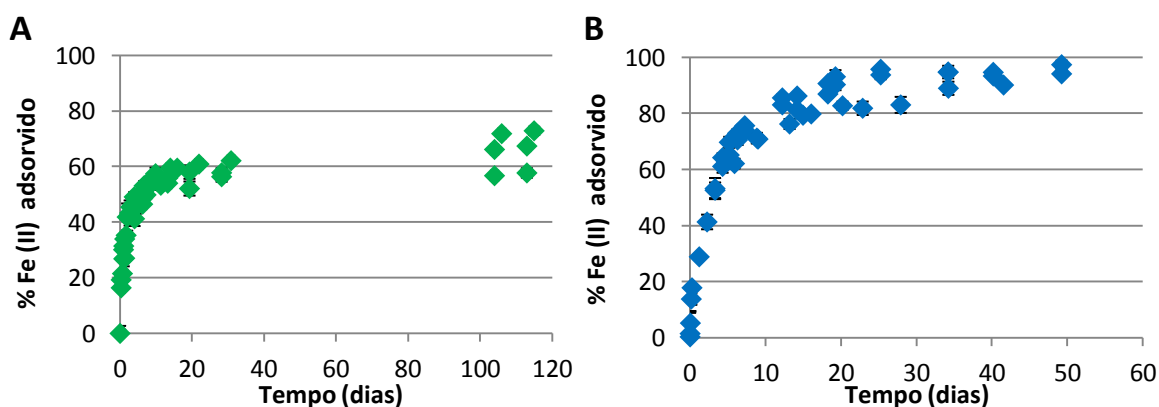


Figura 26. Estudo com Fe II, utilizando (A) 12 cm² e (B) 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de Fe II adsorvido pelo filme, ao longo do tempo, pelo método da *o*-fenantrolina.

Na Figura 27, estão apresentados os gráficos que expressam a quantidade de Fe (II) adsorvido (em μg) por cm^2 de filme de quitosana, para cada um dos ensaios A e B. Em ambos os gráficos observa-se que uma grande parte do Fe (II) é adsorvido nos primeiros dias de ensaio, sendo adsorvidos mais de 300 μg deste composto por cada cm^2 de filme em apenas 10 dias.

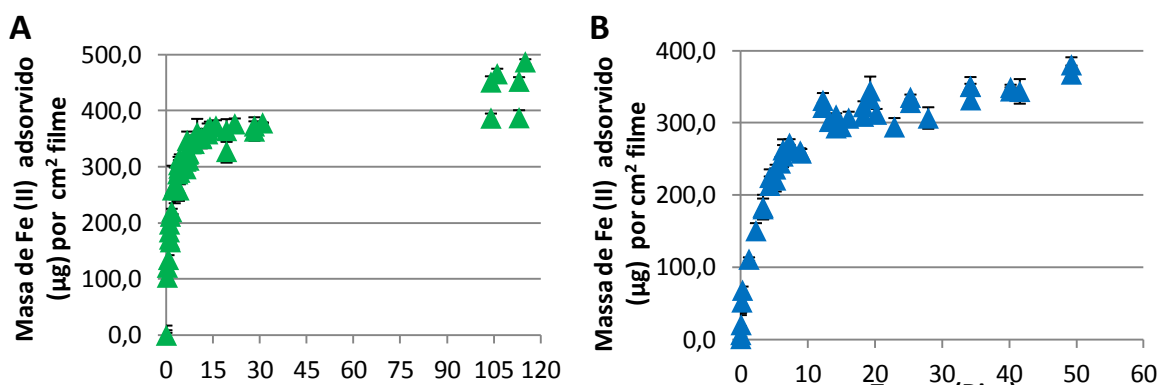


Figura 27. Estudo com Fe (II), utilizando 12 cm^2 (A) e 20 cm^2 (B) de filme à base de quitosana, representando a massa de Fe (II) adsorvido (μg) por cm^2 de filme de quitosana, ao longo do tempo, pelo método da *o*-fenantrolina.

possível destacar-se algumas diferenças entre o ensaio A e o ensaio B. No ensaio A, (sem ter em conta os dados obtidos após o dia 100) ao fim de um mês, onde a quantidade de Fe (II) adsorvida por cm^2 de filme parece manter-se constante, a quantidade máxima de Fe (II) adsorvida pelo filme corresponde a cerca de 370 μg de Fe(II)/ cm^2 de filme e este mesmo valor poderia também corresponder à capacidade máxima de retenção (CMR) do filme para este composto. Isto porque, no ensaio B, a quantidade máxima de Fe (II) adsorvida pelo filme também corresponde a cerca de 370 μg de Fe(II)/ cm^2 de filme. No entanto, no ensaio A, decorridos mais de 100 dias, foram realizadas mais duas análises às soluções em estudo e verificou-se que, alguma quantidade de Fe (II) presente na solução com filme foi ainda adsorvida, durante o intervalo de dois meses. Assim sendo, se todo o Fe (II) presente na solução com filme (≈ 7600 μg de Fe (II)) fosse adsorvido, esperava-se que a quantidade máxima de Fe (II) adsorvida pelo filme, no ensaio A, correspondesse a cerca de 633 μg de Fe (II)/ cm^2 de filme e, no ensaio B, correspondesse a cerca de 380 μg de Fe(II)/ cm^2 de filme. Na prática o que aconteceu é que no ensaio A o Fe (II) não foi todo adsorvido pelo filme (mesmo depois de decorridos mais de 3 meses de ensaio) e o valor da CMR do filme poderá então corresponder a cerca de 450 μg de Fe(II)/ cm^2 de filme (valor relativo aos últimos dias do ensaio). Já no ensaio B, a CMR do filme, corresponde na realidade à

quantidade máxima de Fe (II) possível de ser adsorvida pelo filme uma vez que, passados 50 dias já quase não existe Fe (II) em solução (existindo apenas aproximadamente 3% de Fe (II) em solução).

Na figura 28 são apresentados os gráficos relativos à quantidade de Fe (II) adsorvido durante os primeiros 5 dias de ensaio, o intervalo de tempo em que a interação entre o composto e o filme de quitosana é mais evidente. Em ambos os casos, e tal como aconteceu nos ensaios anteriores com os compostos fenólicos, foi calculada a linha de tendência para os dados de cada um destes gráficos e, a partir da equação da reta, verifica-se que o declive da linha de tendência do ensaio B, onde $m = 762,8 \pm 27,1 \mu\text{g}/\text{dias}$ é maior que o declive da linha de tendência do ensaio A, onde $m = 446,0 \pm 51,1 \mu\text{g}/\text{dias}$. Estes resultados sugerem que, partindo da mesma concentração de Fe (II) em solução e para o mesmo intervalo de tempo de ensaio, foi adsorvida uma maior quantidade deste composto no ensaio B do que no ensaio A. Estas diferenças podem ainda ser interpretadas com uma diferença na velocidade em que ocorre a interação entre o Fe (II) e o filme de quitosana, sendo a velocidade da interação maior no ensaio B em comparação com o ensaio A.

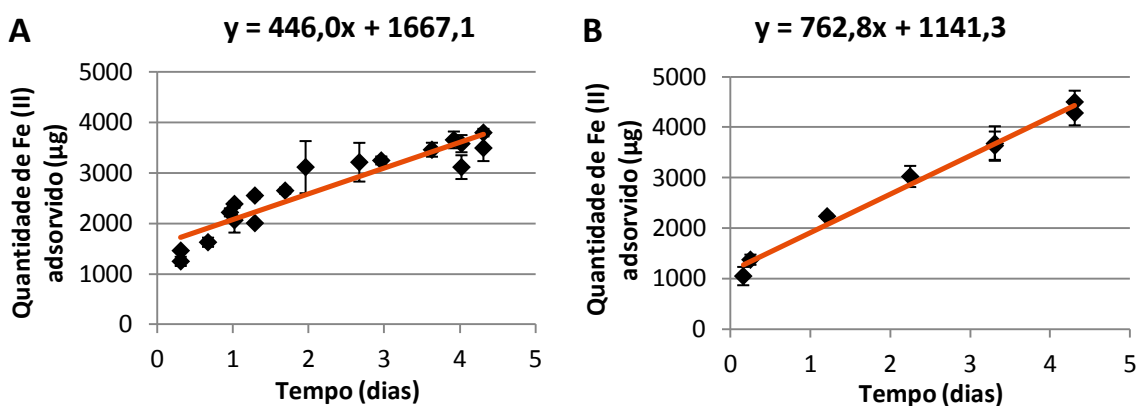


Figura 28. Linha de tendência adicionada aos dados do estudo com Fe (II), utilizando (A) 12 cm² e (B) 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de Fe (II) adsorvido pelo filme durante os primeiros 5 dias, pelo método da *o*-fenantrolina.

Ou seja, verifica-se que a interação entre o filme (adsorvente) e o Fe (II) (adsorbato) depende da quantidade de filme de quitosana, o que está de acordo com o descrito na literatura [50]. Neste caso, um aumento na quantidade de filme levou a um aumento na velocidade de adsorção do Fe (II) pelo filme de quitosana, tal como aconteceu na fração de ANTOC. Por outro lado, comparando a linha de tendência obtida no ensaio A (em que

se utilizaram 12 cm² de filme) com as linhas de tendência obtidas nos ensaios com as três frações de compostos fenólicos (AF, MOF e ANTOC), verifica-se que a velocidade da interação destes compostos com filme de quitosana é bastante mais baixa que a velocidade da interação do catião Fe (II) com a mesma quantidade de filme.

No ensaio representado pela Figura 25A, onde se utilizaram 12 cm² de filme de quitosana, verificou-se que, cerca de 20 dias depois do início do ensaio, foi atingido um equilíbrio entre a quantidade de Fe (II) adsorvido e a quantidade de Fe (II) presente na solução com filme, mantendo-se esta praticamente constante nos dias seguintes. Assim sendo, e uma vez que isso não aconteceu no ensaio B, onde quase todo o Fe (II) presente na solução foi adsorvido pelo filme, realizou-se um novo ensaio, esquematizado na Figura 29, para perceber se o motivo que levou o ensaio A a atingir o estado de equilíbrio poderia ser o facto do filme de quitosana ter atingido a sua capacidade máxima de retenção para este composto, não tendo capacidade de adsorver mais Fe (II).

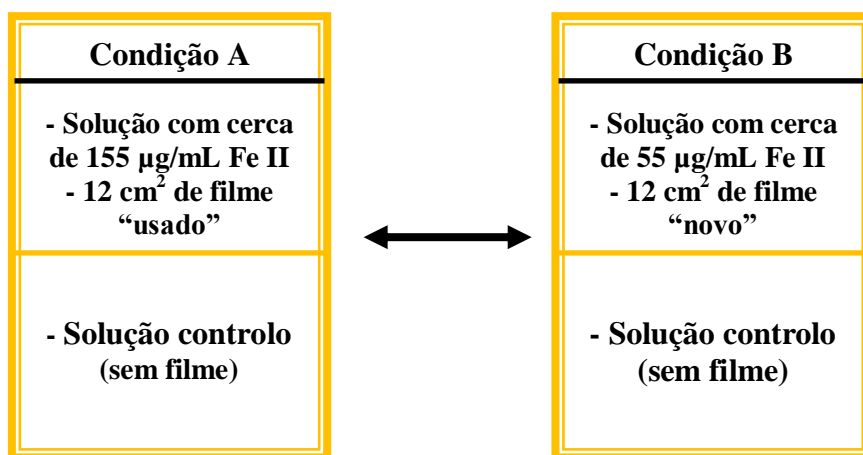


Figura 29. Esquema do estudo realizado para testar a saturação do filme de quitosana utilizado no ensaio A do ponto 4.2.1.

De acordo com os resultados obtidos com este ensaio, que se encontram representados na Tabela 1, verifica-se que na solução A, que tinha uma concentração de Fe (II) $\approx 155 \mu\text{g/mL}$ e na qual foi colocado o filme de quitosana usado (12 cm^2) no ensaio anterior, quase nenhum Fe (II) foi adsorvido pelo filme, ao fim de 50 dias, sendo a diferença de concentração deste composto entre o tempo 0 e o dia 50 inferior a 4 % da concentração inicial de Fe (II) existente em solução. No entanto, na solução B, que tinha uma concentração de Fe (II) cerca de três vezes menor que a da solução A, e na qual foi colocado um filme novo de quitosana (sem ser usado e também com 12 cm^2) o Fe (II) presente na solução foi adsorvido pelo filme ao longo do tempo e ao fim dos 50 dias já praticamente não existia Fe (II) na solução com filme. Quanto às soluções controlo respectivas verificou-se que, decorridos os 50 dias de ensaio, a variação da concentração de Fe (II), em comparação com os valores do tempo 0, não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$ e $n=3$) e portanto, não houve alteração das mesmas ao longo do tempo.

Tabela 1. Resultados obtidos durante o estudo realizado para testar a saturação do filme de quitosana apresentando as variações de concentração de Fe (II) ($\mu\text{g/mL}$) nas soluções A (filme usado) e B (filme novo) e respetivas soluções controlo (sem filme), no tempo 0 e ao fim de 50 dias.

Tempo (dias)	Concentração de Fe (II) ($\mu\text{g/mL}$) A		Concentração de Fe (II) ($\mu\text{g/mL}$) B	
	Filme	Controlo	Filme	Controlo
0	$156,18 \pm 1,65$	$156,18 \pm 1,65$	$54,39 \pm 1,45$	$54,39 \pm 1,45$
50	$150,39 \pm 2,11$	$154,93 \pm 0,98$	$0,00 \pm 0,87$	$55,00 \pm 1,85$

Estes resultados comprovam que o filme de quitosana usado no ensaio A do ponto anterior saturou, não tendo mais locais ativos para quelar o Fe (II) e atingindo assim a sua CMR para este composto, cujo valor corresponde a cerca de $450 \mu\text{g}$ de Fe(II)/ cm^2 de filme de quitosana.

4.3. Interação do Fe (II) e fração de antocianinas com o filme de quitosana

Após a realização dos vários ensaios anteriores, onde cada composto em estudo foi utilizado separadamente: AF, MOF, ANTOC e catião Fe (II), foram feitos novos ensaios, mas desta vez usando a fração de ANTOC e o catião Fe (II) em simultâneo na mesma solução modelo, para ver de que forma se comportariam estes compostos. Os ensaios foram realizados utilizando 20 cm² de filme à base de quitosana.

Num ensaio em que a concentração inicial de Fe (II) presente em solução (≈ 150 $\mu\text{g/mL}$) foi cerca de três vezes maior que a concentração inicial da fração de ANTOC (≈ 46 $\mu\text{g/mL}$ em EqAG), representado pela letra A, verificou-se que a concentração de Fe (II) (cerca de 150 $\mu\text{g/mL}$) se foi mantendo ao longo do tempo na solução controlo (sem filme), enquanto que, na solução com filme, a concentração deste composto foi decrescendo ao longo do tempo, atingindo valores próximos de 10 $\mu\text{g/mL}$ de Fe (II).

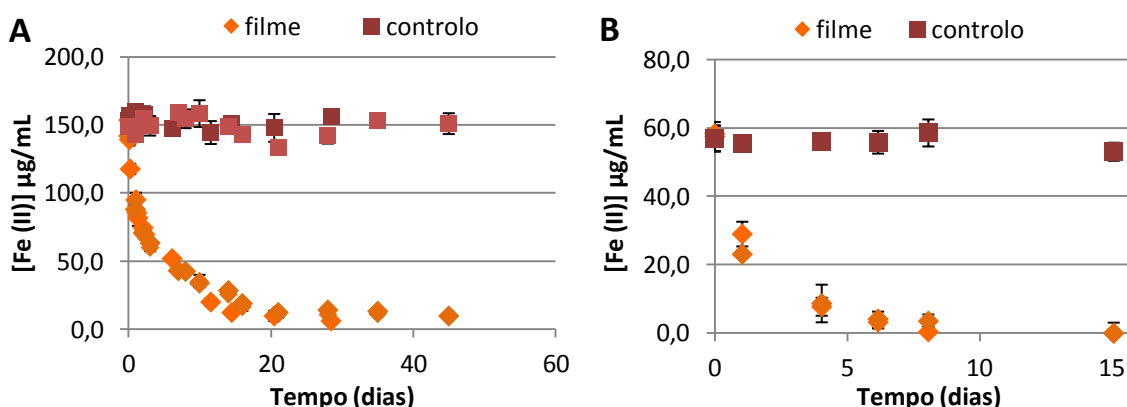


Figura 30. Evolução da concentração de Fe (II) na presença da fração de ANTOC, (A) na proporção de 3:1 e (B) na proporção de 1:4, em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (20 cm²), pelo método da *o*-fenantrolina.

Um segundo ensaio foi realizado (Figura 30B), invertendo-se a proporção dos componentes, onde a concentração inicial de Fe (II) foi de aproximadamente 56 $\mu\text{g/mL}$ e a concentração inicial da fração de ANTOC foi de aproximadamente 244 $\mu\text{g/mL}$ (em equivalentes de AG), cerca de quatro vezes maior que a concentração inicial do Fe (II), tentando desta forma simular as proporções com que cada um dos compostos (Fe e antocianinas) existe num vinho tinto. Neste ensaio verificou-se que a concentração de Fe (II) se manteve ao longo do tempo na solução controlo, e por sua vez, na solução com

filme, a concentração deste composto decresceu, ao longo do tempo, e ao fim de 15 dias atingiu valores muito próximos de 0 $\mu\text{g/mL}$ de Fe (II). Em ambas as condições (A e B) verificou-se a existência de interação entre o Fe (II) e o filme de quitosana, que se traduziu numa diferença de concentração de Fe (II) entre cada uma das soluções controlo e as respetivas soluções com filme, indicando que este composto foi adsorvido pelo filme de quitosana ao longo do tempo.

Quanto à quantificação da fração de ANTOC, na Figura 30A não foi possível determinar a concentração de ANTOC isoladamente, ao longo do tempo, pois a presença do catião Fe (II), por também ser um composto suscetível de ser oxidado/reduzido, interferiu com os métodos utilizados para determinar as antocianinas. No entanto, na Figura 31 é apresentado o gráfico relativo à determinação das ANTOC na condição B (Fe (II) e ANTOC presentes na proporção de 1:4) e observa-se que na solução controlo (sem filme) a concentração de ANTOC não se manteve constante, decrescendo ligeiramente ao longo do tempo (a concentração inicial de ANTOC era cerca de 244 $\mu\text{g/mL}$ em EqAG e decresceu para cerca de 208 $\mu\text{g/mL}$ em EqAG ao fim de 15 dias). Na solução com filme, observa-se que a concentração de ANTOC também foi diminuindo ao longo do tempo, tendo um decréscimo um pouco mais acentuado que o da solução controlo, que diminuiu para cerca de 190 $\mu\text{g/mL}$ em EqAG passados 15 dias de ensaio.

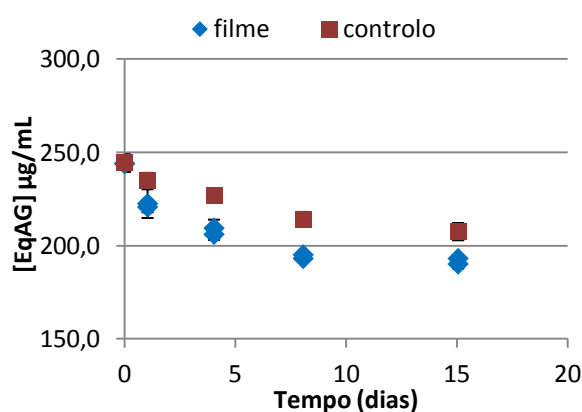


Figura 31. Evolução da concentração de ANTOC na presença de Fe II, na proporção de 4:1, em solução modelo de vinho, ao longo do tempo, para o controlo (sem filme) e em presença do filme à base de quitosana (20 cm^2), pelo método de Folin-Ciocalteu.

Uma vez que na solução controlo não existia filme de quitosana para adsorver os compostos nela presentes, levando à diminuição da concentração dos mesmos, estes resultados poderão significar que existiu algum tipo de interação entre as ANTOC e os catiões Fe (II). Segundo o descrito na literatura, uma das principais características das antocianinas e antocianidinas que contenham um grupo *o*-di-hidroxil no anel B da sua estrutura é a sua capacidade de interatuar com iões de certos metais, como Al, Fe, Cu, Sn, Mg e Mo, formando produtos insolúveis, que são complexos “antocianina-metal” [74, 75]. Assim sendo, é provável que alguma quantidade de antocianinas presente nas soluções tenha complexado com os catiões Fe (II) também presentes em solução, explicando-se assim a diminuição de ANTOC na solução controlo e a observação de que com o passar do tempo, foi visível a presença de um precipitado nas soluções relativas a estes ensaios. Quanto à solução com filme, essa diminuição foi ligeiramente mais acentuada (sendo a diferença entre esta solução e a solução controlo de cerca 17 µg/mL de ANTOC, ao fim dos 15 dias) porque para além das ANTOC poderem ter complexado com o Fe (II), uma parte delas também poderá ter sido adsorvida pelo filme de quitosana ao longo do tempo (provavelmente os cerca de 17 µg/mL de ANTOC).

Na figura 32, onde é expressa a percentagem de composto adsorvido pelo filme de quitosana ao longo do tempo, verifica-se que, no gráfico A, cerca de 93% do catião Fe (II) já tinha sido adsorvido pelo filme nos últimos dias do ensaio. Em comparação com o ensaio em que se utilizou apenas o Fe (II) (Figura 26 B), a tendência dos dados é semelhante entre os dois ensaios e verifica-se que no mesmo período de tempo (perto dos 40 dias) foi adsorvida a mesma % de Fe (II) (93 %) pelo filme de quitosana (20 cm²). No gráfico B, apesar de se ter diminuído a concentração de Fe (II) e aumentado a concentração de ANTOC, observa-se que decorridos apenas 15 dias de ensaio, praticamente todo o Fe (II) presente em solução foi adsorvido pelo filme de quitosana. Ou seja, estes resultados indicam que a presença da fração de ANTOC não parece ter influenciado a adsorção de Fe (II), tendo o filme maior afinidade para este composto do que para a fração de compostos fenólicos (ANTOC) presente em solução.

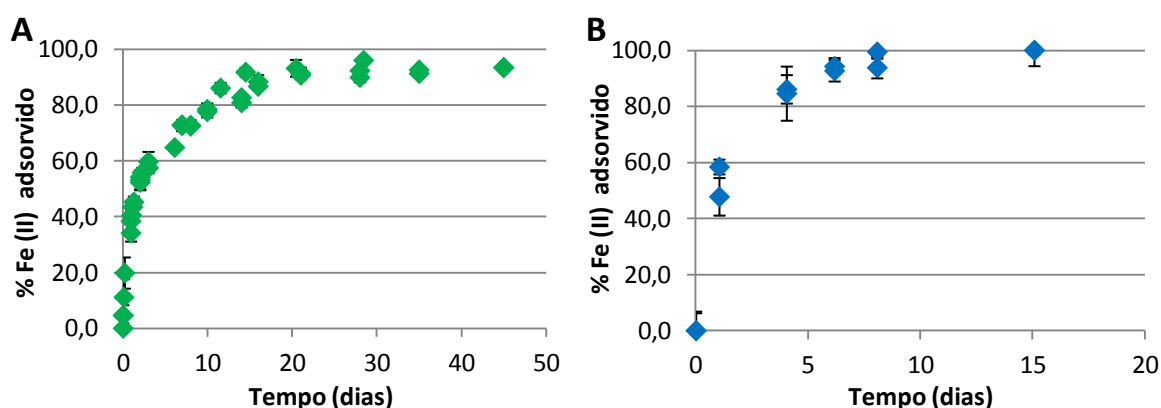


Figura 32. Estudo com Fe II e fração de ANTOC na proporção de 3:1 (gráfico A) e na proporção de 1:4 (gráfico B) utilizando 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a % de Fe (II) adsorvido pelo filme ao longo do tempo, pelo método da *o*-fenantrolina.

No gráfico da Figura 33 é apresentada a linha de tendência traçada sobre os dados relativos à quantidade de Fe (II) adsorvida pelo filme durante os primeiros dias 4 do ensaio. A equação obtida por regressão linear mostra que o valor do declive da linha de tendência (m) corresponde a $1131,3 \pm 132,7$ µg/dias que é superior ao valor obtido no gráfico da Figura 28 B ($m = 762,8 \pm 27,1$ µg/dias) relativo ao ensaio em que só se utilizou o Fe (II) e 20 cm² de filme. Como a única diferença entre estes dois ensaios está na presença da fração de ANTOC, porque as restantes condições foram mantidas, estes resultados poderão significar que alguma quantidade de ANTOC interagiu com os catiões de Fe (II), formando complexos insolúveis. Uma vez que o Fe (II) que ficou complexado com as antocianinas não pode ser quantificado pelo método da *o*-fenantrolina, este efeito da complexação levou a uma maior diminuição da quantidade de Fe (II) em solução (passível de ser quantificado) que, consequentemente, resultou numa maior diferença entre a quantidade de Fe (II) na solução controlo e a quantidade de Fe (II) na solução com filme, ao longo do tempo. Ambos os fenómenos, adsorção e complexação, contribuíram assim para a diminuição da quantidade deste composto em solução, o que acabou por se traduzir num declive mais acentuado da linha de tendência.

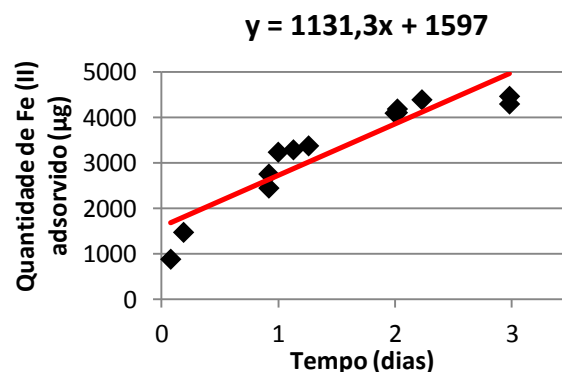


Figura 33. Linha de tendência adicionada aos dados do estudo com Fe (II) e fração de ANTOC, na proporção de 3:1 (gráfico A), utilizando 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de Fe (II) adsorvido pelo filme durante os primeiros 5 dias, pelo método da *o*-fenantrolina.

Em cada um dos gráficos da figura 34 são representados os dados relativos à quantidade (µg) de Fe (II) adsorvida pelo filme de quitosana (que na realidade têm o contributo do efeito da complexação “antocianina-Fe (II)”), nos primeiros 15 dias de ensaio, já que no gráfico B deixa de ser possível quantificar o catião Fe (II) ao fim desse tempo, e aos quais foi adicionada uma linha de tendência. No gráfico B da figura observa-se que praticamente todo o Fe (II) presente em solução (≈ 2800 µg de Fe (II)) foi adsorvido após os primeiros 15 dias de ensaio. No entanto, em comparação com o ensaio A, verifica-se que essa mesma quantidade de Fe (II) é adsorvida durante o primeiro dia de ensaio.

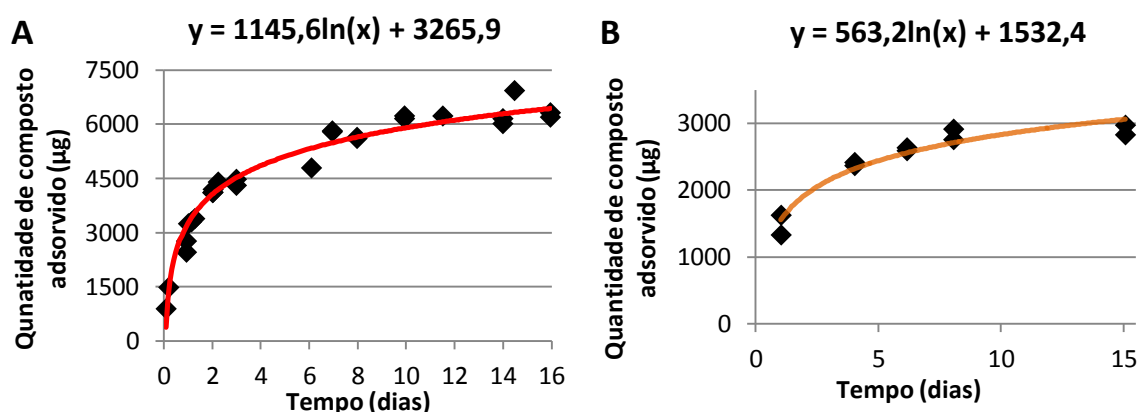


Figura 34. Linha de tendência adicionada aos dados do estudo com Fe (II) e fração de ANTOC na proporção de 3:1 (gráfico A) e na proporção de 1:4 (gráfico B) utilizando 20 cm² de filme à base de quitosana, representando a quantidade (µg) de Fe (II) adsorvido pelo filme durante os primeiros 15 dias, pelo método da *o*-fenantrolina.

Para se poder comparar as cinéticas destes dois últimos ensaios, a linha de tendência traçada em cada um dos gráficos (A e B) foi obtida por uma regressão logarítmica. Os dados do gráfico A (onde o ensaio foi iniciado com cerca de 150 µg/mL de Fe (II)) apresentam um declive maior da sua linha de tendência, $a = 1145,6$ µg/dias em comparação com o declive obtido no gráfico B, $a = 563,2$ µg/dias (onde o ensaio foi iniciado com cerca de 56 µg/mL de Fe (II)). Ou seja, estes valores poderão indicar que a cinética da interação entre o Fe (II) e o filme de quitosana foi menor no ensaio B do que no ensaio A, o que poderá dever-se ao facto do ensaio B ter sido iniciado como uma concentração cerca de três vezes mais baixa de Fe (II) em comparação com o ensaio B. Deste modo, comprova-se que a concentração (ou quantidade) de adsorbato em solução influencia a interação com o adsorvente e neste caso, uma menor concentração de adsorbato (Fe (II)) tornou a interação mais lenta [52].

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho permitiram concluir que em todos os ensaios realizados existiu interação entre os compostos em estudo, AF, MOF, ANTOC e Fe(II), e o filme à base de quitosana reticulado com genipina. No entanto, a interação foi diferente para cada tipo de composto. Nos ensaios com as três diferentes classes de compostos fenólicos, onde se utilizou 12 cm² de filme de quitosana, verificou-se que apesar do filme, de um modo geral, ter adsorvido a mesma percentagem (cerca de 50%) de composto presente na solução com filme de quitosana, essa interação ocorreu a velocidades diferentes. A classe dos compostos que apresentou menor velocidade de interação com o filme foi a dos ácidos fenólicos (AF), enquanto que as frações de monómeros e oligómeros flavonóides (MOF) e antocianinas (ANTOC) foram adsorvidas a velocidade semelhante, contudo, cerca de 2 vezes superior à velocidade de adsorção dos AF. O aumento da quantidade de filme para 20 cm² em contacto com os compostos fenólicos, fração de ANTOC, originou um aumento da velocidade da interação em cerca de 40%. Quanto aos ensaios realizados com o catião Fe (II), concluiu-se que em comparação com qualquer uma das frações de compostos fenólicos estudadas, o filme tem muito maior afinidade para este composto. No ensaio realizado com 12 cm² de filme de quitosana cerca de 70 % do Fe (II) presente em solução foi adsorvido e a quantidade máxima de retenção para este composto foi de 450 µg (Fe (II))/cm² de filme de quitosana. Com o aumento da quantidade de filme de quitosana para 20 cm², verificou-se que praticamente todo o Fe (II) (97%) em solução foi adsorvido pelo filme, sendo a velocidade também superior.

Na presença de ANTOC e o catião Fe (II) em simultâneo, o filme de quitosana adsorve a mesma quantidade de Fe (II) e com a mesma velocidade, demonstrando que o filme apresenta grande afinidade para este catião metálico, não havendo alteração dessa interação na presença de compostos fenólicos em solução, mesmo quando a proporção de Fe (II) em relação aos compostos fenólicos é reduzida. Para além da existência de interação entre o catião Fe (II) e o filme de quitosana, verificou-se que estes dois compostos (Fe (II) e antocianina) também interagem entre si, por complexação, originando compostos insolúveis.

A quantidade de filme usado no vinho (para o conservar) é de 100 cm^2 de filme de quitosana por litro de vinho, sabendo que a quantidade máxima de ferro (na forma de cátions) presente num vinho é de 20 mg/L e que a capacidade máxima de adsorção de Fe (II) no filme é de $450\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ de filme, pode-se estimar que o filme pode adsorver cerca de 45 mg de Fe (II) (mais do dobro da quantidade de Fe existente) o que significa que praticamente todo o Fe (II) será adsorvido pelo filme de quitosana. Nos vinhos tintos, uma vez que a presença de uma maior concentração de compostos fenólicos não influencia a capacidade de remoção de Fe dos filmes, a quantidade de filme a ser utilizada por litro de vinho poderá ser diminuída para cerca de metade do filme (45 cm^2), pois esta área de filme é ainda suficiente para remover o Fe presente no vinho. Ou seja, utilizando uma quantidade menor de filme, por um lado, poderá ser possível manter o seu efeito antioxidante no vinho, e por outro lado, poderá também ser diminuída a adsorção de compostos fenólicos pelo filme. Metade de um filme de quitosana apenas remove do vinho cerca de $0,5\%$ do conteúdo em compostos fenólicos.

Estes resultados demonstram que o filme de quitosana tem um efeito antioxidante nos vinhos muito provavelmente devido à sua capacidade de adsorção de cátions de metais de transição, como o cátion Fe (II). Estes cátions catalisam os mecanismos de oxidação que ocorrem no vinho, e ao serem adsorvidos pelo filme, deixam de estar livres em solução e não poderão participar nos mecanismos oxidativos. Por outro lado, e apesar do filme de quitosana ter demonstrado capacidade de adsorver os compostos fenólicos, a quantidade de compostos fenólicos adsorvida é insignificante quando comparada com a quantidade total destes compostos presentes no vinho, mantendo-se assim as suas características organoléticas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em conta os resultados obtidos, futuramente seria interessante otimizar os ensaios realizados neste trabalho, tentando para isso: iniciar todos os ensaios com iguais concentrações de compostos em estudo; tentar simular as proporções reais dos compostos estudados presentes no vinho; testar outras quantidades de filme e outras concentrações de compostos em solução e utilizar outro tipo de métodos (com maior sensibilidade) para fazer a determinação dos compostos em estudo ao longo do tempo e alterar outros parâmetros que possam influenciar a interação do filme com os compostos (como o pH da solução, por exemplo).

Seria importante também estudar as interações entre o filme de quitosana e outro tipo de compostos presentes no vinho, quer separadamente, quer em simultâneo, para tentar perceber como é que estes se comportam na presença do filme.

Como a quitosana tem sido aplicada em várias áreas, também seria interessante num trabalho futuro aplicar o filme de quitosana reticulada com genipina a outras matrizes, que não o vinho, e estudar as interações entre este e os compostos presentes nessas matrizes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prashanth K. V. H, Tharanathan R. N., *Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview*, Trends in Food Science & Technology, 2007, 18: 117-131.
2. Coimbra M. A., Nunes C., Maricato E., Cunha A., Lopes da Silva J. A. and Mendo S., 2011, *Process for production of wines without sulphur dioxide by the use of chitosan-based films*, Portuguese Patent Application PT_105981 A1.
3. Site: http://www.academiadovinho.com.br/ela_quimica.php consultado em 20-11-2013.
4. Moreas V., Locatelli C., *Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde*, Evidência, 2010, 10: 57-68.
5. Li H., Guo A., & Wang H., *Mechanisms of oxidative browning of wine*, Food Chemistry, 2008, 108: 1-13.
6. Elias R. J., Andersen M. L., Skibsted L. H., Waterhouse A. L., *Identification of Free Radical Intermediates in Oxidized Wine Using Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 4359-4365.
7. Singleton V. L. A., *Survey of wine ageing reactions, especially with oxygen. Proceedings of the ASEV 50th Anniversary Annual Meeting*, Davis, California: American Society for Enology and Viticulture, 2000, 323-336.
8. Oliveira C. M., Ferreira A. C., De Freitas V., Silva A. M., *Oxidation mechanisms occurring in wines*, Food Research International, 2011, 44: 1115-1126.
9. Toit W. J., Marais J., Pretorius I. S., & Toit M., *Oxygen in must and wine – A review*, South African Journal of Enology and Viticulture, 2006, 27: 76-94.
10. Fulcrand H., Cheynier V., Oszmianski J., & Moutounet M., *An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation*, Phytochemistry, 1997, 46: 223-227.
11. Gbmez E., Martinez A., & Laencina J., *Prevention of oxidative browning during wine storage*, Food Research International, 1995, 28: 213-217.

12. Spagna G., Pifferi P. G., Rangoni C., Mattivi F., Nicolini G., Palmonari R., *The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan*, Food Research International, 1996, 29: 241-248.
13. Benítez P., Castro R., Sanchez P. J., & Barroso C. G., *Influence of metallic content of fino sherry wine on its susceptibility to browning*, Food Research International, 2002, 35: 785–791.
14. Lasanta C., Caro I., & Perez L., *Theoretical model for ion exchange of iron (III) in chelating resins: Application to metal ion removal from wine*, Chemical Engineering Science, 2005, 60: 3477–3486.
15. Woraratphoka J., Intarapichet K-O, Indrapichate K., *Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand*, Food Chemistry, 2007, 104: 1485–1490.
16. Waterhouse A. L., *Wine phenolics*, Annals of the New York Academy of Sciences, 2002, 957: 21–36.
17. Fracassetti D., Lawrence N., Tredoux A. G. J., Tirelli A., Nieuwoudt H. H., Du Toit W. J., *Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method*, Food Chemistry, 2011, 128: 1136–1142.
18. Labrousche F., Clark A. C., Prenzler P. D., & Scollary G. R., *Isomeric influence on the oxidative coloration of phenolic compounds in a model white wine: comparison of (+)-catechin and (-)-epicatechin*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 9993–9998.
19. Singleton V., *Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: observations and practical implications*, American Journal of Enology and Viticulture, 1987, 38: 69-77.
20. Danilewicz J. C., Secombe J. T., & Whelan J., *Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine*, American Journal of Enology and Viticulture, 2008, 59: 128–136.
21. Pohl P., *What do metals tell us about wine?*, Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26: 941-949.

22. Mozaz S. R., Sotro A. G., Segovia J. G., Azpilicueta C. A., *Influence of decantation of viura must on the cation content. Evolution during wine fermentation and stabilization*, Food Research International, 1999, 32: 683.
23. Frias S., Trujillo J. P., Pena E. M., Conde J. E., *Classification and differentiation of bottled sweet wines of Canary Islands (Spain) by their metallic content*, European Food Research and Technology, 2001, 213: 145-149.
24. Galani-Nikolakaki S., Nallithrakas-Kontos N., Katsanos A.A., *Trace element analysis of Cretan wines and wine products*, Science of the Total Environment, 2002, 285: 155-163.
25. Jos A., Moreno I., Gonzalez A. G., Repetto G., Camean A. M., *Differentiation of sparkling wines (cava and champagne) according to their mineral content*, Talanta, 2004, 63: 377-382.
26. Lara R., Cerutti S., Salonia J. A., Olsina R. A., Martinez L. D., *Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES*, Food and Chemical Toxicology, 2005, 43: 293-297.
27. Danilewicz J. C., *Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine Model System: Central Role of Iron and Copper*, American Journal of Enology and Viticulture, 2007, 58: 53-60.
28. Benitez P., Castro R., Sanchez Pazo J.A., Barroso C.G., *Influence of metallic content of fino sherry wine on its susceptibility to browning*, Food Research International, 2002, 35: 785-791.
29. Danilewicz J. C., *Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper*, American Journal of Enology and Viticulture, 2003, 54: 73–85.
30. Waterhouse A. L., & Laurie V. F., *Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses*, American Journal of Enology and Viticulture, 2006, 57: 306–313.
31. Choe E., & Min D. B., *Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods*, Journal of Food Science, 2005, 70: 142–159.
32. Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E., *Principles and Practices of Winemaking (Chinese trans.)*, Beijing: China Light Industry Press, 2001.

33. Ferreira S. L. C., Ferreira H. S., de Jesus R. M., Santos J. V. S., Brandao G. C., Souza A. S., *Development of method for the speciation of inorganic iron in wine samples*, Analytica Chimica Acta, 2007, 602: 89–93.
34. Cacho J., Castells J. E., Esteban A., Laguna B., Sagrista N., *Iron, Copper, and Manganese Influence on Wine Oxidation*, American Journal of Enology and Viticulture, 1995, 46: 380.
35. Oszmianski J., Cheynier V., Moutounet M., *Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44: 1712-1715.
36. Del Alamo M., Nevares I., Carcel L. M., *Redox potential evolution during red wine aging in alternative systems*, Analytica Chimica Acta, 2006, 563, 223–228.
37. Zhu M., Li W., & Guo Q., *Wine enology* (revised ed.), Beijing:Light Industry Press, 1983.
38. Clark A. C., & Scollary G. R., *Copper(II)-mediated oxidation of (+)-catechin in a model white wine system*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 2002, 8: 186–195.
39. Danilewicz, J. C., *Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper*, American Journal of Enology and Viticulture, 2003, 54: 73–85.
40. Casettari L., Gennari L., Angelino D., Ninfali P., Castagnino E., *ORAC of chitosan and its derivatives*, Food Hydrocolloids, 2012, 28: 243-247.
41. Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C. P., *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation*, Progress in Polymer Science, 2009, 34: 641–678.
42. Majeti N. V., Kumar R., *A review of chitin and chitosan applications*, Reactive & Functional Polymers, 2000, 46: 1–27.
43. Wan Ngah W. S., Teonga L. C., Hanafiah M. A. K. M., *Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review*, Carbohydrate Polymers, 2011, 83: 1446–1456.
44. Wan Ngah W. S., Ab Ghani S., Kamari A., *Adsorption behaviour of Fe(II) and Fe(III) ions in aqueous solution on chitosan and cross-linked chitosan beads*, Bioresource Technology, 2005, 96: 443–450.

45. Krishnapriya K. R., Kandaswamy M., *A new chitosan biopolymer derivative as metal-complexing agent: synthesis, characterization, and metal(II) ion adsorption studies*, Carbohydrate Research, 2010, 345: 2013–2022.
46. Guibal E., *Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review*, Progress in Polymer Science, 2005, 30: 71–109.
47. Camacho A. P., Rocha M. O., Brauer J. M., Verdugo A. Z., Félix F., Ortega M. M., Gómez M. S., Jatomea M., *Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal Properties*, Carbohydrate Polymers, 2010, 82: 305–315.
48. Giner M. J., Vegara S., Funes L., Martí N., Saura D., Micol V., Valero M., *Antimicrobial activity of food-compatible plant extracts and chitosan against naturally occurring micro-organisms in tomato juice*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92: 1917–1923.
49. Wang S-G, Sun X-F, Liu X-W, Gong W-X, Gao B-Y, Bao N., *Chitosan hydrogel beads for fulvic acid adsorption: Behaviors and mechanisms*, Chemical Engineering Journal, 2008, 142: 239–247.
50. Nunes C., Maricato É., Cunha Â, Nunes A., Silva J., Coimbra M., *Chitosan–caffeic acid–genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media*, Carbohydrate Polymers, 2013, 91: 236–243.
51. Liu J., Lu J., Kan J., Tang Y., Jin C., *Preparation, characterization and antioxidant activity of phenolic acids grafted carboxymethyl chitosan*, International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 62: 85–93.
52. Soto M. L., Moure A., Dominguez H., Parajo J. C., *Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review*, Journal of Food Engineering, 2011, 105: 1–27.
53. Cantarelli C. & Mantovani L., *Sperimentazione di trattamenti innovativi per mosti destinati alla produzione di vini base*, Industrie Bevande, 1988, 17: 337–344.
54. Guibal E., *Metal ion interactions with chitosan—a review*. Separation and Purification Technology, 2004, 38: 43–74.
55. Varma A. J., Deshpande S. V., Kennedy J. F., *Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review*, Carbohydrate Polymers, 2004, 55: 77–93.

56. Dzul M. S., Saucedo T. I., Navarro R., Avila M., Guibal E., *Cadmium sorption on chitosan sorbents: kinetic and equilibrium studies*, Hydrometallurgy, 2001, 61: 157–67.
57. Hsien T-Y, Rorrer G. L., *Heterogeneous cross-linking of chitosan gel beads: kinetics, modeling, and influence on cadmium ion adsorption capacity*, Industrial and Engineering Chemistry Research, 1997, 36: 3631–8.
58. Escudero A., Asensio E., Cacho J., & Ferreira V., *Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants*, Food Chemistry, 2002, 77: 325–331.
59. Bonilla F., Mayen M., Merida J., & Medina M., *Yeasts used as fining treatment to correct browning in white wines*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 1928–1933.
60. Santos M. C., Nunes C., Saraiva J. A., and Coimbra M. A., *Chemical and physical methodologies for the replacement / reduction of sulfur dioxide use during winemaking review of their potentialities and limitations*, European Food Research and Technology, 2012, 234:1–12.
61. Pozo-Bayo M. A., Monagas, M., Bartolomé B., Moreno-Arribas M. V., *Wine Features Related to Safety and Consumer Health: An Integrated Perspective*, Critical Reviews, Food Science and Nutrition, 2012, 52:31–54.
62. Li H., Wang H., Yuan C., & Wang S., *Wine chemistry*. Beijing:Scientific Publishing Company, 2005.
63. Taylor S. L., Higley N. A., Bush R. K., *Sulfites in foods: Uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity.*, Advances in Food Research, 1986, 30: 1–76.
64. Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., & Lonvaud A., *Handbook of enology (2nd ed.). The microbiology of wine and vinifications (Vol. 1)*, Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd., 2006.
65. Sun B, Leandro M.C., de Freitas V., Spranger M. I. *Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, 2006, 1128: 27–38.
66. Huang D, Ou B, Prior D.L., *The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 1841–1856.

67. Walker R. B., Everette J. D., *Comparative Reaction Rates of Various Antioxidants with ABTS Radical Cation*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, **57**: 1156–1161.
68. Rover M. R., Brown R. C., *Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method*, Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2013.
69. Cicco N., Lattanzio V., *The Influence of Initial Carbonate Concentration on the Folin–Ciocalteu Micro-Method for the Determination of Phenolics with Low Concentration in the Presence of Methanol: A Comparative Study of Real-Time Monitored Reactions*, American Journal of Analytical Chemistry, 2011, 2: 840-848.
70. Braunschweig J., Bosch J., Heister K., Kuebeck C., Meckenstock R. U., *Reevaluation of colorimetric iron determination methods commonly used in geomicrobiology*, Journal of Microbiological Methods, 2012, 89: 41–48.
71. Belcher R., *Application of chelate Compounds in Analytical Chemistry*, Pure and Applied Chemistry, 1973, 34:13-27.
72. Fracassetti D., Lawrence N., Tredoux A. G. J., Tirelli A., Nieuwoudt H. H., Du Toit W. J., *Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method*, Food Chemistry, 2011, 128: 1136–1142.
73. Bordignon C. L., Francescatto V., Nienow A. L., calvete E., Reginatto, F. H., *Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango*, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2009, 29: 183-188.
74. Lopes T., Xavier M., Quadri M. G. N., Quadri M. B., *Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade*, Revista Bras. Agrociência, 2007, 13: 291-297.
75. Ovando A. C., Hernandez M. L. P., Hernandez, M. E., Rodriguez, J. A., Vidal, C.A. G., *Chemical studies of anthocyanins: A review*, Food Chemistry, 2009, 113: 859–871.

8. ANEXOS

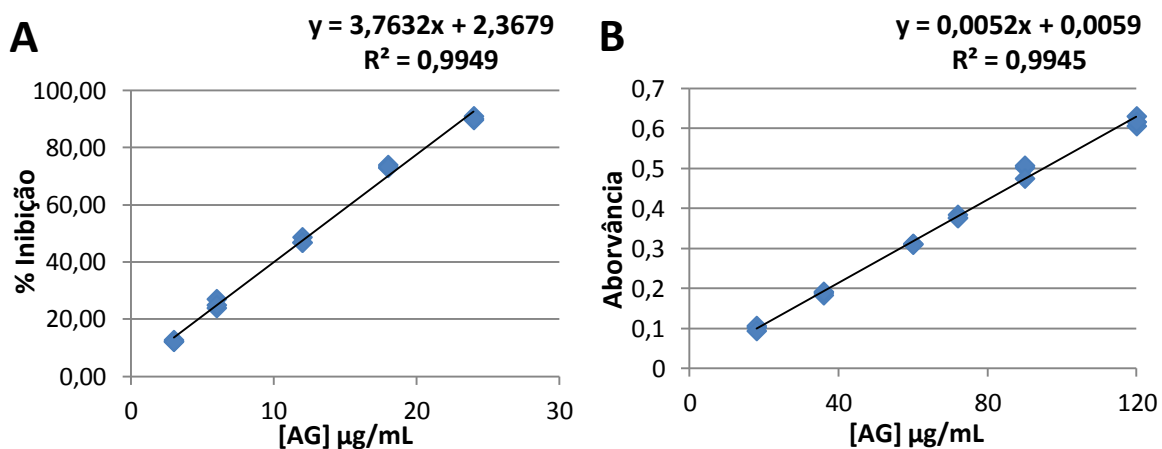


Figura 35. Curva de calibração do ácido gálico (A) pelo método do ABTS e (B) pelo método de Folin-Ciocalteu.

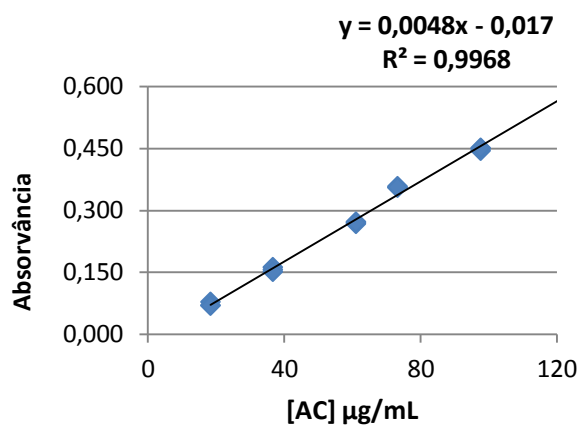


Figura 36. Curva de calibração do ácido cafeico pelo método de Folin-Ciocalteu.

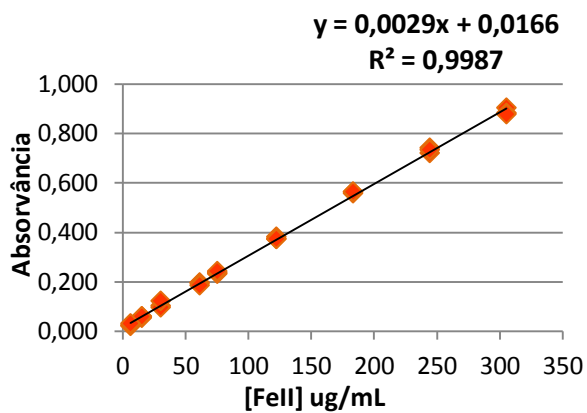


Figura 37. Curva de calibração do catião Fe (II) pelo método da *o*-fenantrolina.